

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**Estudio en modelos "In vitro" y "Ex vivo" de los efectos
inmunomoduladores del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2
producido por bacterias ácido lácticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

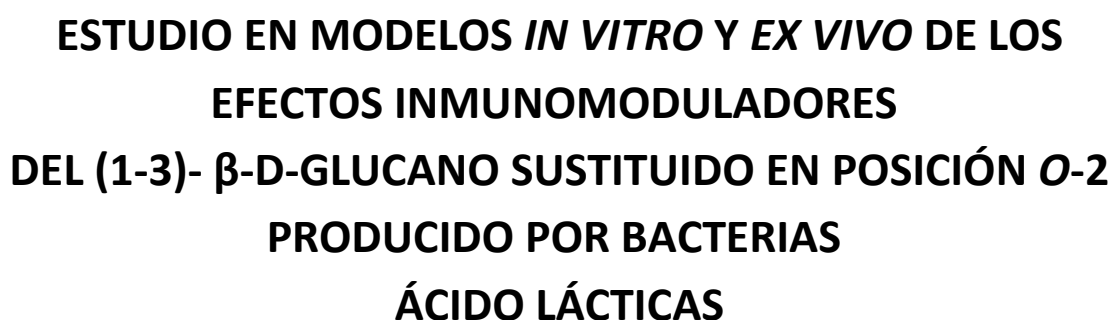
PRESENTADA POR

Sara Notararigo

Directora

Paloma López García

Madrid, 2015



Sara Notararigo

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIO EN MODELOS *IN VITRO* Y *EX VIVO* DE LOS
EFECTOS INMUNOMODULADORES
DEL (1-3)- β -D-GLUCANO SUSTITUIDO EN POSICIÓN O-2
PRODUCIDO POR BACTERIAS
ÁCIDO LÁCTICAS**

Sara Notararigo

Memoria para optar al Grado de Doctor por la Universidad
Complutense de Madrid

DIRECTORA
Dra. Paloma López García

Madrid, 2015



Dra. Paloma López García, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada " Estudio en modelos *in vitro* y *ex vivo* de los efectos inmunomoduladores del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2 producido por bacterias ácido lácticas" ha sido realizada por la Doctoranda Sara Notararigo en el Laboratorio de biología molecular de las bacterias gram positivas, bajo mi dirección y autorizo su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Madrid, a 21 de Mayo de 2015

Fdo.: Dra. Paloma López García

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de una ayuda para el desarrollo de tesis doctorales en el marco del programa “Junta para la Ampliación de Estudios” de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, subprograma JAE-Predoc (referencia: JAEPre013, convocatoria del año 2009).

Este trabajo también fue financiado con la subvención concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad, para la realización del Proyecto del Plan Nacional: “Identificación de polisacáridos prebióticos y bacterias probióticas con capacidad inmunomoduladora para su uso en nuevos alimentos funcionales” (referencia: AGL2012-40084-C03-01).

ÍNDICE

RESUMEN	XIX
SUMMARY	V
ABREVIATURAS	IX

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Las bacterias ácido lácticas	1
1.1 Clasificación.....	2
1.2 Metabolitos	3
2. Los exopolisacáridos microbianos	4
2.1 Clasificación de los exopolisacáridos	5
2.2 Biosíntesis de los EPS de las BAL.....	7
2.3 Funciones y aplicaciones de los EPSs microbianos	10
3. Probióticos	12
4. Prebióticos, oligosacáridos y polisacáridos.....	13
4.1 Clasificación de los hidratos de carbono prebióticos	16
5. Las BAL productoras de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2 ..	16
6. El sistema inmune humano.....	19
6.1 La inmunidad innata	21
6.2 La Inmunidad adquirida.	24
7. El sistema inmune intestinal	25
7.1 La tolerancia inmunitaria intestinal	27
7.2 La regulación del sistema inmune por células epiteliales	29
8. La inmunomodulación por los β -D-glucanos	30
8.1 Los receptores de los β -D-glucanos	33
8.2 La transducción de señales específicas activadas por el reconocimiento de los β -D-glucanos.....	35

OBJETIVOS	39
-----------------	----

CAPÍTULO 1

Producción, aislamiento y purificación de (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2	
1. INTRODUCCIÓN.....	41
2. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	42

2.2 Producción del EPS P por <i>P. parvulus</i> 2.6	42
2.3 Producción del EPS L por <i>L. lactis</i> NZ9000[pNGTF].....	43
2.4 Aislamiento del EPS P a partir del sobrenadante del cultivo de <i>P. parvulus</i>	
2.6	43
2.5 Aislamiento del EPS L a partir del sobrenadante de <i>L. lactis</i> NZ9000[pNGTF]	
.....	44
2.6 Purificación del EPS P y del EPS L.....	44
2.7 Determinación de la concentración de los EPSs y de la presencia de	
contaminantes	45
2.8 Detección de los EPSs por microscopía electrónica	46
2.9 Análisis de los EPSs por espectroscopia de infrarrojos.....	47
2.10 Análisis de la composición de monosacáridos de los EPSs.....	47
2.11 Análisis de metilación de los EPSs	48
3. RESULTADOS	49
3.1 Producción de los EPSs por <i>P. parvulus</i> 2.6 y <i>L. lactis</i> NZ9000[pNGTF].....	49
3.2 Recuperación y purificación inicial de los EPSs.....	50
3.3 Purificación, estimación de la masa molecular y determinación de la	
composición de monosacáridos de los EPSs.....	51
3.4 Espectros infrarrojos de los EPSs	52
3.5 Determinación de los tipos de enlaces de los EPSs	53
4. DISCUSIÓN	54

CAPÍTULO 2

Inmunomodulación de los macrófagos humanos M1 y PMA-THP-1 por los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2

1. INTRODUCCIÓN.....	55
2. MATERIALES Y METODOS	59
2.1 Producción y purificación de los EPSs.....	59
2.2. Cultivos celulares	59
2.2.1 Los macrófagos M1.....	59
2.2.2 La línea celular humana THP-1	60
2.2.3 Estimulación de la inflamación en los macrófagos PMA-THP-1	60
2.3 Ensayo de citotoxicidad	61

2.4 Ensayo de inmunomodulación de macrófagos.....	62
2.4.1 Determinación de los niveles de citoquinas	62
2.4.2 Análisis de las vías de señalización de los macrófagos	64
2.4.3 Análisis bioinformático funcional	65
2.5 Detección de la interacción de (1-3)- β -glucanos con el receptor Dectin-1...	67
2.5.1 Cultivo de la línea celular B3Z	67
2.5.2 Inmovilización de los ligandos y determinación de la actividad β -galactosidasa.....	68
2.6 Análisis estadístico	68
3. RESULTADOS	69
3.1 Efecto de los EPSs sobre la actividad metabólica de macrófagos humanos .	69
3.2 Influencia de los LPSs de distintos serotipos de <i>E. coli</i> sobre la respuesta inflamatoria de los macrófagos PMA-THP-1.....	70
3.3 Efecto de los EPSs en la regulación de la inflamación por los macrófagos M1 y PMA-THP-1	71
3.4 Análisis de la capacidad de unión de los EPSs al receptor Dectin-1	72
3.5 Influencia de los EPSs sobre las vías de señalización de los macrófagos M1	73
3.6 Estudio funcional de las vías de señalización de macrófagos M1 estimuladas por los EPSs	76
4. DISCUSIÓN	79

CAPÍTULO 3

Efectos inmunomoduladores de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición O-2, en modelo *in vitro* de inflamación intestinal humana

1. INTRODUCCIÓN.....	87
2 MATERIALES Y MÉTODOS	91
2.1 Cultivos celulares	91
2.2 Ensayo de citotoxicidad	91
2.3 Co-cultivo celular y modelo <i>in vitro</i> de mucosa intestinal inflamada	91
2.3.1. Tratamientos experimentales.....	93
2.4 Determinación de los niveles de citoquinas	93
2.5 Extracción y análisis del RNA total	95
2.6 Síntesis de cDNA a partir de preparaciones de RNA total	96

2.7 Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa	97
2.8 Análisis estadístico	98
3. RESULTADOS	98
3.1 Efectos de los (1-3)- β -D-glucanos sobre la viabilidad de las células Caco-2 .	98
3.2 Establecimiento de un modelo <i>in vitro</i> de inflamación intestinal con co- cultivo de enterocitos Caco-2 y macrófagos PMA-THP-1	99
3.3 Inmounomodulación de las células Caco-2 y PMA-THP-1 por los (1-3)- β -D- glucanos ramificados en modelo <i>in vitro</i> de inflamación intestinal.....	104
3.4 Inmunomodulación de monocultivos de macrófagos PMA-THP-1 por los (1- 3)- β -D-glucanos.....	108
3.5 influencia de los (1-3)- β -D-glucanos sobre la expresión génica de células epiteliales y macrófagos en modelo <i>in vitro</i> intestinal de co-cultivo	110
4. DISCUSIÓN	116

CAPÍTULO 4

Efecto de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2 en modelo *ex vivo* de
biopsias de pacientes de enfermedad de Crohn

1. INTRODUCCIÓN.....	121
2. MATERIALES Y METODOS	123
2.1 Muestras	123
2.2 Modelo <i>ex vivo</i>	124
2.3 Determinación de los niveles de citoquinas	124
2.4 Extracción del RNA total	125
2.5 Reacción de qPCR.....	126
2.6 Estudio de las vías de señalización del factor de transcripción NF κ B	126
2.6 Análisis estadístico	128
2.7 Análisis funcional bioinformático	128
3. RESULTADOS	128
3.1 Pacientes y muestras	128
3.2 Influencia de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados sobre los niveles de citoquinas en tejido intestinal	129
3.3 Influencia de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en el perfil de expresión de genes inflamatorios en tejido intestinal	130

3.4 Influencia del EPS L y el EPS P en el perfil de expresión de genes pertenecientes a las vías reguladas por el factor transcripcional NFκB en tejido intestinal	132
3.5 Estudio funcional del efecto a nivel transcripcional de los EPSs sobre las vías reguladas por el NFκB en tejido intestinal	133
3.5.1 Agrupamiento funcional de los genes modulados por el tratamiento con el EPS L	133
3.5.2 Agrupamiento funcional de los genes modulados por el tratamiento con el EPS P.....	136
3.5.3 Enriquecimiento en términos de ontología génica para los genes modulados por el tratamiento con los EPSs	139
4. DISCUSIÓN	139

CAPÍTULO 5

Los (1-3)-β-D-glucanos sustituidos en posición *O*-2 bacterianos: potenciales agentes antivirales e inmunomoduladores de salmónidos

1. INTRODUCCIÓN.....	149
2 MATERIALES Y METODOS	153
2.1 Los (1-3)-β-D-glucanos sustituidos en posición <i>O</i> -2	153
2.2 Cultivos de células de salmónidos y del virus de la necrosis pancreática infecciosa	153
2.3 Ensayo de citotoxicidad	154
2.4 Ensayos de actividad antiviral.....	155
2.5 Análisis de la expresión génica en macrófagos	156
3. RESULTADOS	158
3.1 Efecto antiviral de los EPSs frente a la infección de fibroblastos por el VPNI	158
3.2 Efectos de los EPSs en la expresión génica de los interferones codificados por los macrófagos.....	159
4. DISCUSIÓN	161

DISCUSIÓN GENERAL

1. Introducción a la discusión general	165
2. Purificación de los (1-3)-β-D-glucanos sustituidos en posición <i>O</i> -2	166

3. Vías de señalización afectadas por el tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos	168
4. Análisis comparativo de la influencia detectada de los (1-3)- β -D-glucanos y de la laminarina utilizando modelos <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i>	174
5. Efecto antiviral de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2	183
CONCLUSIONES GENERALES	187
BIBLIOGRAFÍA	191
APÉNDICES	XIII

RESUMEN

Los (1-3)- β -D-glucanos lineales y con ramificaciones (1-6) y (1-4) sintetizados por plantas y hongos son inmunomoduladores y algunos de ellos se utilizan para la elaboración de alimentos funcionales.

Los exopolisacáridos (EPSs) sintetizados y secretados por bacterias ácido lácticas (BAL) son polímeros extensamente estudiados por su amplia aplicación industrial incluyendo la industria farmacéutica y por jugar un papel primordial en las propiedades organolépticas de diversos productos fermentados. Además, la enzima glicosiltransferasa GTF, de un grupo reducido de BAL aisladas de bebidas alcohólicas, sintetiza (1-3)- β -D-glucanos con sustituciones en *O*-2. Estudios previos han mostrado, que este tipo de EPS tiene propiedades prebióticas y su presencia contribuye a la capacidad de unión de la bacteria productora a células epiteliales del intestino humano. Sin embargo, su potencial como inmunomoduladores no había sido previamente investigado.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han producido dos (1-3)- β -D-glucanos con sustituciones en posición *O*-2, utilizando cultivos de dos BAL: *P. parvulus* 2.6 aislada de sidra y la bacteria recombinante *Lactococcus lactis* NZ9000[pNGTF], que expresa la proteína GTF de la estirpe 2.6.

Los EPSs han sido recuperados y purificados a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, mediante precipitación con etanol, fraccionamiento cromatográfico y diálisis. Los métodos utilizados han permitido obtener preparaciones de ambos polímeros, sin contaminación detectable de RNA, DNA o proteínas, aptos para estudios inmunológicos.

Los polisacáridos purificados han sido utilizados para caracterizar su potencial inmunomodulador y sus propiedades anti-inflamatorias, en distintos modelos *in vitro* y *ex vivo* de inflamación intestinal en humanos.

En modelos *in vitro*, se ha evaluado el efecto de los EPSs sobre macrófagos pro-inflamatorios humanos: diferenciados a partir de monocitos (M1) y a partir de la línea celular monocitaria THP-1 (PMA-THP-1). No se detectó citotoxicidad y se ha comprobado un efecto inmunomodulador sobre ambos tipos de macrófagos. En condiciones de co-tratamiento con el LPS inflamatorio de *E. coli* ambos EPSs produjeron un incremento de los niveles de secreción de las citoquinas TNF- α , IL-12 p40 e IL-10, así como un aumento de la proporción anti-inflamatoria IL-10/TNF- α . Además, los EPSs alteraron en los macrófagos M1 el patrón de fosforilación de diversas quinasas, activando las vías de señalización PI3K/mTOR/AKT, ErbB y de uniones adherentes.

En modelo *in vitro* (en formato “transwell”) de mucosa intestinal humana inflamada, constituido por las líneas de células humanas Caco-2 (enterocitos) y PMA-THP-1 (macrófagos), los EPSs no mostraron toxicidad sobre las células Caco-2. Además, los polímeros provocaron cambios en los perfiles de expresión de citoquinas secretadas a nivel proteico (TNF- α , IL-10 e IL-8) y transcripcional (TSLP, IL-8 e IL-10), que demostraron el establecimiento de comunicación entre ambas líneas.

En modelo *ex vivo* con biopsias de tejido de pacientes de enfermedad de Crohn, los tratamientos con los EPSs también tuvieron un efecto potencialmente anti-inflamatorio y alteraron la transcripción de diferentes mediadores regulados por el factor de transcripción NF κ B.

En conjunto, los resultados obtenidos con los distintos modelos de intestino humano han demostrado que los tratamientos con los (1-3)- β -D-glucanos con sustituciones en O-2 producen una estimulación del sistema inmune, regulando la expresión de citoquinas y vías de señalización que afectan procesos de migración, proliferación y supervivencia celular, y se ha observado diferencias entre los efectos producidos por cada uno de los dos EPSs estudiados.

Finalmente, los polisacáridos purificados, también han sido utilizados para investigar en modelos *in vitro* de salmónidos su potencial como agentes antivirales e

inmunomoduladores. En modelo *in vitro* de infección de fibroblastos BF-2 de *Lepomis macrochirus* con el virus de la necrosis pancreática infectiva, los β -D-glucanos mostraron ausencia de toxicidad, inhibición de los efectos citopáticos y reducción del título vírico. En modelo *in vitro* de macrófagos primarios de truchas arco iris, los EPSs provocaron una inducción de la expresión de los genes que codifican los interferones IFN- γ e IFN-I, mostrando así una estimulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa.

Así, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral muestran un potencial de los (1-3)- β -D-glucanos con sustituciones en posición O-2 como agentes inmunomoduladores y anti-inflamatorios de utilidad para la elaboración de alimentos funcionales o también en medicina humana o veterinaria.

SUMMARY

Linear (1-3)- β -D-glucans containing (1-6) and (1-4) branches synthesised by plants and fungi are immunomodulators, and some of them are utilised for the preparation of functional foods.

The exopolysaccharides (EPSs) synthesised and secreted by lactic acid bacteria (LAB) are polymers that have been extensively studied for a wide number of industrial applications including pharmaceutical applications and also for their role in improving organoleptic properties in various fermented food.

The enzyme, glycosyltransferase GTF, that occurs in a small group of LAB isolated from alcoholic drinks, synthesise (1-3)- β -D-glucans with substitutions at O-2. Previous studies have shown that this type of EPS has prebiotic properties and its presence enhances the adhesion of the producing LAB to the epithelial cells of the human intestine. However, their potential as immunomodulators had not, at that point, been investigated.

The work presented here in this doctoral thesis focuses on two (1-3)- β -D-glucans with substitutions at O-2 that are synthesised by the LAB strains *Pediococcus parvulus* 2.6 (isolated from cider) and the recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000[pNGTF] which expresses the GTF protein of *P. parvulus* 2.6. The EPSs have been extracted and purified from the culture supernatants by means of ethanol precipitation, chromatographic separation and dialysis. This produced samples of both EPSs that had no detectable contamination with DNA, RNA or protein, and were therefore suitable for immunological studies. The purified EPSs were then evaluated to determine their immunomodulatory, and anti-inflammatory activities, using various *in vitro* and *ex vivo* models of human intestinal inflammation.

An *in vitro* evaluation involved testing the effect of the EPSs against human pro-inflammatory macrophages derived from monocytes (M1) or from the THP-1 (PMA-THP-1) monocyte cell line. No cytotoxicity was observed, and immunomodulatory events were detected in both types of macrophage. When the EPSs were co-

administered with the pro-inflammatory LPS of *Escherichia coli*, both caused an increase in the levels of secreted cytokines TNF- α , IL-12, p40 and IL-10, as well as an increase in the anti-inflammatory ratio of IL10/TNF- α . Furthermore, in M1 macrophages, both EPSs altered the pattern of phosphorylation of various kinases, thereby activating routes of signalling of PQ3K/mTOR/AKT, ErbB and of adherent unions.

In a further *in vitro* model, based on inflamed human intestinal mucosa, the two EPSs were tested, against human Caco-2 epithelial cells and PMA-THP-1 macrophages, in a transwell format. The EPSs caused no cytotoxicity against the Caco-2 cells. However, these polymers provoked changes in the expression profiles of TNF- α , IL10 and IL8 (at the protein level) and of TCLP, IL8 and IL10 (at the transcriptional level), thereby demonstrating a communication between the 2 cell-lines.

Biopsy tissue from patients suffering from Crohn's disease was used as the basis of an *ex vivo* model. When treated with EPSs showed a potentially anti-inflammatory response, with alteration of the transcription of various regulatory mediators of NF κ B.

Overall, the above models have shown that treatment with (1-3)- β -D-glucans with substitutions at O-2 produce stimulation of the immune system, thereby modulating the expression of cytokines and signalling routes that affect the processes of cell migration, proliferation and survival. Moreover, differences in effect were observed between the two EPSs used in these studies.

Finally, the two purified EPSs were tested in *in vitro* salmonid models to determine their potential as antiviral agents as well as immunomodulators. When BF-2 fibroblasts (from *Lepomis macrochirus*) infected with infective pancreatic necrosis virus were treated with the EPSs there was no sign of cellular toxicity, rather, an inhibition of cytopathology, and a reduction of the viral titre. In an *in vitro* model using rainbow trout primary macrophages, the EPSs provoked the induction of the

expression of the genes that code for the interferons IFN- γ and IFN-I, thus showing a stimulation of both the innate and adaptive immune responses.

In summary, the results obtained in the course of this doctoral thesis show the potential of the (1-3)- β -D-glucans with substitutions at *O*-2 as immunomodulatory and anti-inflammatory agents with possible future applications in functional foods or even possibly in veterinary or human medicine.

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia
 AGCC: ácidos grasos de cadena corta
 Akt: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
 AMPc: adenosín monofosfato cíclico
 AU: unidades arbitrarias
 B3Z: línea celular hibridoma de células T
 BAL: bacteria ácido láctica
 BALs: bacteria ácido lácticas
 BALB: Bagg Albino
 BBID: Base de Imágenes de Bioquímica Biológica
 BCL2A2: B-cell lymphoma 2 isoform 2A
 BCL2L1: B-cell lymphoma 2 isoform L1
 BCL3: B-cell lymphoma 3
 BDCA-1: blood DC antigen-1
 BF-2: Bluegill fry-2 fibroblast like cell line derived from a trypsinised suspension of pooled caudal portions of the trunk of 1 year old fingerlings of Bluegill fry (*Lepomis macrochirus*)
 BP: Biological process
 Caco-2: línea celular epitelial humana de adenocarcinoma colorrectal
 Card9: Caspase recruitment domain-containing protein 9
 CC: Celular compartment
 CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2
 CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5
 CD: cluster de diferenciación
 CDM: medio definido
 cDNA: complementary DNA
 CDs: células dendríticas
 CHK-2: Checkpoint kinase
 CIB: Centro de Investigaciones Biológicas
 CNIC: Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas
 CPRG: Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside
 CR3: Receptor del complemento 3
 CR4: receptor del complemento 4
 Creb: cAMP response element-binding protein
 CSF3: Colony stimulator factor 3
 CSIC: Consejo Superior de Investigación Científica
 Ct: Cycle Threshold
 CXCR1: chemokine (C-X-C motif) receptor 1
 D.A.V.I.D.: Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado
 DAC-A: anticuerpo de detección A
 DAC-B: anticuerpo de detección B
 dATP: Deoxyadenosine triphosphate
 DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
 dCTP: Deoxycytidine triphosphate
 Dectin-1-CD3 ζ: construcción quimérica de la región extracelular de Dectin 1 fusionada a la región citoplásmica del clúster de diferenciación 3 zeta
 Dectin-1: dendritic cell associated C-type lectin-1
 dGTP: Deoxyguanosine triphosphate
 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
 DNA: ácido desoxirribonucleico
 DNasas: desoxirribonucleasas
 DTT: Dithiothreitol
 dTTP: Deoxythymidine triphosphate
 EC: Enfermedad de Crohn
 ECP: efecto citopático
 EF-1α: factor de elongación 1α
 EFSA: European Food Safety Agency

ELK-1: ETS domain-containing protein Elk-1
 EPS L: exopolisacárido producido por *Lactococcus lactis* pNGTF
 EPS P: exopolisacárido producido por *Pediococcus parvulus* 2.6
 EPS: exopolisacárido
 EpsD: Exopolysaccharide biosynthesis protein, putative glycosyl transferase EpsD
 EpsE: Exopolysaccharide biosynthesis protein, putative glycosyl transferase EpsE
 EPSs: exopolisacáridos
 ErbB: erythroblastic leukemia viral oncogene
 ERK 1/2: Extracellular Signal-Regulated Kinase
 ESTY: medio selectivo enumeration *Streptococcus thermophilus* yogurt
 ETS: E26 transformation-specific
 FAK: quinasa de adhesión focal
 FAO: Food and Agriculture Organization
 FBS: suero fetal bovino
 FC: Factor de crecimiento
 FCγRI: Fc (Fragment, crystallizable)-gamma receptor 1
 FDA: Food and Drug Administration
 Fig: figura
 Fos: Finkel–Biskis–Jenkins murine osteogenic sarcoma
 FOS: fructo-oligosacáridos
 fosfo-galactosiltransferasa
 fosfo-glucosiltransferasa
 Fox P3: forkhead box P3
 FSs: fructansacararas
 Fyn: Fibroblast Yes related novel
 GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue
 GDP: guanosín difosfato
 GHs: glicosilhidrolasas
 GM-CSF: granulocyte macrophage-colony stimulin factor
 GO: Gene Ontology
 GRAS: generally recognized as safe
 grB: Growth factor receptor-bound protein
 Gss: glucansacararas
 GTF: β-glicosiltransferasa
 GTP: guanosín trifosfato
 HePs: heteropolisacáridos
 HL-60: Human promyelocytic leukemia cells línea celular humana monocítica derivada de leucemia promielotica
 HMOX1: heme oxygenase (decycling) 1
 HoPs: homopolisacáridos
 HRP: peroxidasa de rábano
 HSP27: Heat shock protein 27
 HT-29 MTX: mucus secreting HT-29 cell line
 HT-29: línea celular epitelial humana de adenocarcinoma colorrectal
 IBD: Inflammatory bowel disease
 iC3: componente 3 del complemento inactivado
 IFN: interferón
 IFNγ: interferón gamma
 Ig: inmunoglobulina
 Igs: inmunoglobulinas
 IKKE: Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells, Kinase epsilon
 IL: interleuquina
 IL1R1: Interleukin 1 receptor, type I
 IRAK1: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
 IRF1: Interferon regulatory factor 1
 IRF3: Interferon regulatory factor 3
 JNK: Jun N-terminal Kinase

Jun: Fos-binding protein p39
 kDa: quilo dalton
 KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto
 LACCER: Receptor Lactosilceramida
 LacZ: lactose operon zeta
 LBP: LPS binding protein
 LPS: Lipopolisacárido
 LPSs: lipopolisacáridos
 LTBR: lymphotoxin beta receptor
 M1: macrófagos humanos pro-inflamatorios
 M2D: Antígeno linfocitario 96
 MAP3K1: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1
 MAPK: mitogen-activated protein kinase
 Mek 1/2: Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase
 MF: Molecular Function
 MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
 MIP2: Macrophage Inflammatory Protein 2
 MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
 Mr: masa molecular aparente
 MRS: medio Man Rogosa Sharpe
 MSK1/2: Mitogen and stress-activated proteine kinase 1/2
 MST: medio semidefinido
 mTor: mammalian target of rapamycin
 MyD88: gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieolide
 NDP-azúcares: nucleótido difosfato-azúcar
 NFAT: nuclear factor of activated T-cells
 NFkB: factor nuclear kappa B
 NFkB1E: Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells
 NFkB2: Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit
 NK: natural killer
 NMR: Resonancia magnética nuclear
 oligo (dT): short sequence of deoxy-thymine nucleotides
 p38: proteína quinasa p38
 p70S6K: Ribosomal protein S6 kinase beta-1
 p90rsk: ribosomal s6 kinase subfamilies p90
 PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns
 PBMC: células mononucleares periféricas de sangre humana
 PBS: tampón fosfato salino
 PCR: Polymerase chain reaction
 PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
 PI3K/AKT/mTOR: fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa-B/diana de rapamicina de mamíferos
 PIP3: fosfoinositol-3-fosfato
 PKC: Protein kinase C
 PMA-THP-1: línea celular humana monocitica THP-1 diferenciada a macrófago por medio de PMA
 PMA: forbol 12-miristato 14-acetato
 Poli I:C: Polyinosinic:polycytidylic acid
 PPIA: Ciclofilina A
 PPRs: Pattern Recognition Receptors
 PSIP1: PC4 (positive cofactor 4) and SFRS1(serine/arginine-rich splicing factor 1) interacting protein 1
 Pten: Phosphatase and tensin homolog
 qPCR: quantitative polymerase chain reaction
 QPS: qualified presumption of safety
 Raf: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
 RAF1: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma1
 Ras: Rat sarcoma
 REL: V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog
 RELB: V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B

RIN: RNA integrity number
 RIPK1: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
 RNA: ácido ribonucleico
 RNasas: ribonucleasas
 RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute
 RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
 RT: reverse transcriptase
 RTK: receptor tirosín-quinasa
 Shc: (Src homology 2 domain-containing) transforming protein
 SIGN-R1: SIGN (Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)-Related gene 1
 SOS: QSon of Sevenless (Ras subfamily of small GTPases)
 SR: scavenger receptor
 Src: tyrosine-protein kinase proto-oncogene
 STAT: Signal transducer and activator of transcription
 Syk: Spleen tyrosine kinase
 TCID50: título vírico capaz de infectar al 50% de las células del cultivo de 1000 virus mL-1
 TEER: Transepithelial electrical resistance
 TGF- β : factor de crecimiento transformante β
 TGI: tracto gastrointestinal
 Th1: célula T helper 1
 THP-1: Tamm-Horsfall protein 1 línea celular humana monocítica derivada de leucemia aguda
 TIMP1: tissue metalloproteinase inhibitor 1
 TIR: Toll/IL-1 Receptor
 TIRAP: toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein
 TLR: Toll like receptor
 TLRs: Toll like receptors
 TNF- α : tumor necrosis factor alpha
 TNFRSF10A: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
 TRAF: TNF receptor-associated factor
 TRAM: TIR domain-containing adapter molecule 2
 TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
 TSLP: Thymic stromal lymphopoietin
 U937: línea celular humana monocítica derivada de linfoma histiocítico Derived from malignant cells of a pleural effusion of 37 year old caucasian male with diffuse histiocytic lymphoma
 UDP-glucosa: uridina difosfato glucosa
 VNPI: virus de la necrosis pancreática infecciosa
 WHO: World Health Organization
 XOS: xylo-oligosacáridos
 XTT: (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-tetrazolio-5-carboxanil
 Yes: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yamaguchi sarcoma
 β -gal: beta-galactosidasa

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Las bacterias ácido lácticas

A principios del siglo XX las bacterias ácido lácticas (BAL) se conocían únicamente como aquellas bacterias capaces de acidificar la leche y, sólo, en 1919, Orla-Jensen relacionó estas bacterias con la producción de ácido láctico, sentando las bases para su clasificación [1]. Como criterios diferenciales se utilizaron la morfología celular, el tipo de azúcar fermentado, la temperatura de crecimiento y el patrón de utilización de los azúcares, y de esa forma se reconocieron los géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Posteriormente, empleando técnicas de biología molecular, se añadieron otros géneros a los cuatro anteriormente citados, incluyendo actualmente: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. En la actualidad, hay más de 20 géneros, que pertenecen a la familia *Firmicutes* (fig. 1), considerándose el género *Lactobacillus* el más extendido.

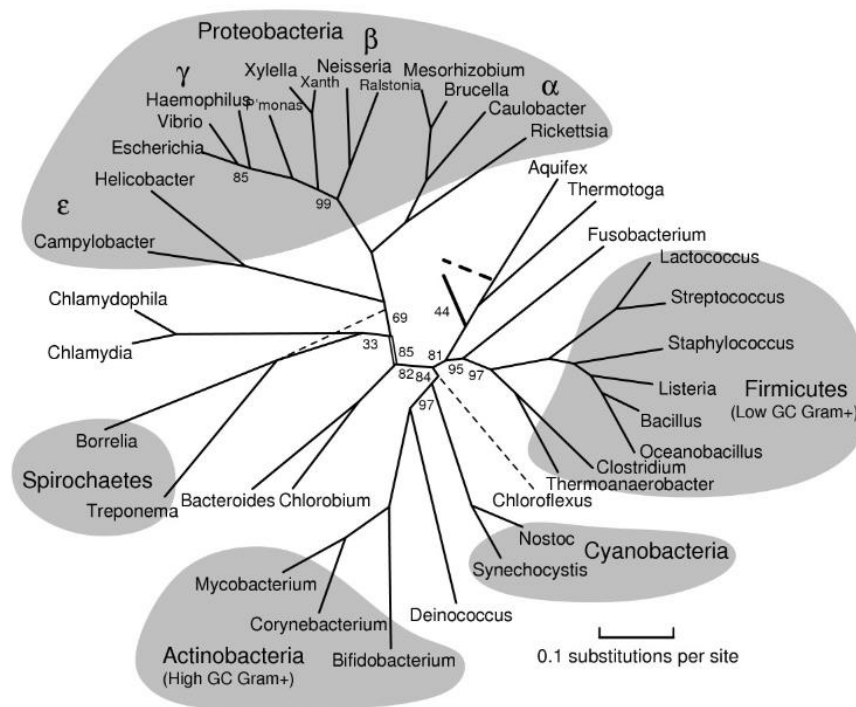


Figura 1. Árbol filogenético de las bacterias. Tomado de M. Bern, et al. (2005) [2].

En principio, las BALs se asociaban a productos fermentados la mayoría poseen calidad alimentaria y algunas son beneficiosas para la salud (probióticos); aunque

existen especies dentro de algunos géneros (*Streptococcus*, *Enterococcus* y *Carnobacterium*) que son patógenos para animales y humanos [3].

1.1 Clasificación

Las BAL constituyen un grupo muy heterogéneo de bacterias con pared Gram-positiva [4], no esporuladas, inmóviles, con forma de cocos y bacilos catalasa negativas [5] al carecer de la capacidad de biosíntesis del grupo hemo. Son anaerobias estrictas o facultativas y tienen en común la capacidad de producir ácido láctico en la fermentación de azúcares. Son microorganismos con una limitada capacidad biosintética, por lo que, para su crecimiento requieren sustratos complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos. Como no disponen de porfirinas y citocromos, no realizan la fosforilación por transporte de electrones sino a nivel de sustrato, produciendo energía únicamente por vía fermentativa [5, 6].

De acuerdo con la clasificación taxonómica pertenecen a la familia Phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* agrupándose dentro de este orden varias familias [7].

Desde el punto de vista de su metabolismo, las BAL se pueden clasificar atendiendo al tipo de fermentación en:

- Las BAL homofermentativas, que sólo producen ácido láctico utilizando la vía principal de fermentación de la glucosa a través de la enzima aldolasa, la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas [5]. Este grupo está compuesto por algunos *Lactobacillus* y por la mayoría de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*.
- Las BAL heterofermentativas, que producen ácido láctico y otros compuestos. Poseen la enzima fosfocetolasa que convierten hexosas en pentosas por la vía de la 6-fosfogluconatofosfocetolasa [5]. En este grupo se incluyen cepas pertenecientes a los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*.

En cuanto a su temperatura óptima de crecimiento pueden ser:

- BAL mesófilas, cuya temperatura de incubación es aproximadamente 30-37 °C. Entre ellas se encuentran *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *L. Lactis* subsp. *Cremoris*, *L. Lactis* biovar. *Diacetilactis* o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* [3].
- BAL termófilas, cuya temperatura óptima ideal de crecimiento es de 40-45 °C, Entre este tipo de especies se encuentran entre otras: *Lactobacillus delbruekii* subsp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, y *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* [3].

1.2 Metabolitos

Las BAL se caracterizan por la producción de metabolitos secundarios, como ácidos orgánicos, polisacáridos, vitaminas y edulcorantes; que confieren propiedades organolépticas y reológicas a los alimentos que las contienen. Asimismo, estos metabolitos hacen posible la interacción con el hospedador de especies de la microbiota que colonizan las cavidades del cuerpo.

Por ejemplo, la producción de ácido propiónico es una fermentación efectuada por bacterias heterofermentativas. En ella, el ácido láctico se transforma en ácido propiónico y acético con desprendimiento de CO₂, el cual forma los orificios en algunos tipos de quesos. Esta molécula pertenece a la familia de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que se consideran prebióticos importantes [3, 5]. Por otro lado, el ácido láctico se ha empleado tradicionalmente para la fermentación y preservación de comestibles. Fue descubierto por Scheele en 1780 (en la leche cortada), quien inicialmente lo consideró como un componente de la leche. En 1789, Lavoisier llamó a este compuesto: ácido láctico. En 1857, Pasteur descubrió que no era propiamente un componente de la leche, pero sí un metabolito de la fermentación láctica generado por ciertos microorganismos. Está clasificado como un compuesto, cuya utilización en alimentos no conlleva ningún riesgo para la salud (GRAS, “*generally recognized as safe*”), y su empleo como aditivo alimenticio o conservante está permitido por la agencia estadounidense (FDA, “*Food and Drug*

Administration") [6] y la europea de control y seguridad de alimentos (EFSA, "*European Food Safety Agency*") [8].

Además, las BAL producen un conjunto de compuestos antimicrobianos (como ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuterociclina, péptidos antifúngicos y bacteriocinas) [6], que han sido utilizados como bioconservantes en productos alimenticios, con el objeto de evitar la proliferación de patógenos como *Listeria*, *Clostridium* y *Staphylococcus aureus* [9] u hongos del género *Fusarium* [10]. En concreto, las bacteriocinas típicamente tienen un estrecho espectro antibacteriano, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram-positivas patógenas o dañinas y, en algunos casos, también de levaduras y especies Gram-negativas [11]. Se trata de péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático, que han sido objeto de numerosas investigaciones en los últimos años por su novedoso uso potencial como conservantes naturales en alimentos, así como con fines médicos en el desarrollo de nuevas terapias sustituyendo a ciertos antibióticos [12].

2. Los exopolisacáridos microbianos

Los exopolisacáridos (EPSs) son un grupo heterogéneo de polisacáridos liberados al medio extracelular por numerosos seres vivos, si bien los de origen microbiano presentan especial relevancia desde el punto de vista industrial. Los producen Archeobacterias como *Halomonas campisalis* [13], bacterias Gram-negativas como *Xanthomonas campestris* [13] y Gram-positivas como *Pediococcus parvulus* [14], hongos y levaduras como *Schizophyllum commune* [15], *Cryptococcus* sp. [16] y microalgas como *Porphyridium cruentum* [17].

A lo largo de las últimas décadas se han descrito las estructuras, mecanismos de biosíntesis y funciones de muchos de dichos polisacáridos; aunque sólo unos pocos han sido elegidos como candidatos para su explotación industrial. Estos biopolímeros son utilizados normalmente en la industria alimentaria por su viscosidad y capacidad de emulsionar. En un principio, se emplearon como espesantes alimentarios que además mejoraban la textura de los alimentos sin

perjudicar su sabor [18], y posteriormente, se estudió su potencial como prebióticos [20] y otras propiedades funcionales. En este sentido y en el caso específico de los EPS producidos por BAL, su papel inmunomodulador [19], anticancerígeno [20] e inhibidor de la absorción del colesterol en la sangre [21]. Debido a estas propiedades, recientemente se están empezando a utilizar como aditivos en alimentos funcionales y como inmunomoduladores [20].

2.1 Clasificación de los exopolisacáridos

Los exopolisacáridos son biomoléculas formadas por la unión de un elevado número de monosacáridos, los cuales se unen repetitivamente mediante enlaces glucosídicos detallados más abajo. Estos compuestos llegan a tener una masa molecular muy elevada, dependiendo del número de residuos que participen en su estructura. Este número es casi siempre indeterminado, a diferencia de lo que ocurre con otros biopolímeros, como el DNA o las proteínas; que tienen en su cadena un número fijo de unidades, definido por una secuencia específica.

Los EPSs pueden presentar una gran diversidad estructural, ya que los diferentes monosacáridos pueden formar el enlace glicosídico en su configuración α o β , y a través de distintas posiciones, originando largas cadenas, lineales o ramificadas [22].

En función de su composición química, los EPSs se pueden clasificar en:

- Homopolisacáridos (HoPs): constituidos por repeticiones de un mismo monosacárido. Dentro de este grupo se encuentran los α -glucanos y los β -glucanos (lineales o ramificados); los D-fructanos lineales (estructura fructofuranosa) de tipo inulina, con enlace $\beta(2-1)$ y de tipo levano, con enlace $\beta(2-6)$
 - α -D-glucanos, como el dextrano (producido por *L. mesenteroides*), con una cadena principal $\alpha(1-6)$ y con algunas ramificaciones en posición 3 [23]; el mutano (producido por *Streptococcus mutans*), homopolímero de glucosa con más de un 50 % de enlaces $\alpha(1-3)$ y ramificaciones $\alpha(1-6)$ [24] y el alternano, con enlaces alternantes $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-3)$ [25].
 - β -D-glucanos, son un grupo variado de polímeros que se diferencian en su estructura, masa molecular, solubilidad, viscosidad y configuración

tridimensional (3D). Entre ellos, destaca la celulosa bacteriana con estructura $\beta(1-4)$, y los $\beta(1-3)$ -glucanos, también ampliamente distribuidos en distintos grupos taxonómicos [14, 22, 26]. La estructura química varía según la especie estudiada. Así, el curdlano es un $\beta(1-3)$ -glucano lineal; si bien, se considera una excepción porque en la mayoría de los casos los β -glucanos son polímeros más o menos ramificados: con una cadena principal $\beta(1-3)$ y sustituciones en $\beta(1-6)$ [27], y menos frecuentemente $\beta(1-2)$; como ocurre en polisacáridos de hongos y algunas bacterias [14].

- Heteropolisacáridos (HePs): formados por unidades repetidas de oligosacáridos, constituidos por dos o más residuos diferentes. Las unidades repetitivas pueden llegar a ser muy complejas, ya que la cadena principal puede estar formada por diferentes monosacáridos enlazados mediante diversos tipos de enlace y ramificarse dando lugar a cadenas laterales de diferente longitud, composición y estructura. Incluso, es frecuente encontrar en estos polímeros, sustituyentes no glucídicos, como fosfato, acetilo y glicerol [28]. Ejemplos conocidos son: el xantano, que consta de una cadena principal de $\beta(1-4)$ -glucopiranosas (como la celulosa), pero una de cada dos unidades de esta cadena central está conectada a un trisacárido de manosa, ácido glucurónico y manosa. La manosa más cercana a la cadena principal tiene un éster de ácido acético en el carbono 6, y la manosa final del trisacárido presenta enlaces que unen sus carbonos 6 y 4 con el segundo carbono de un ácido pirúvico [29]. El gelano, en el que la unidad de repetición es un tetrasacárido con la estructura $[D\text{-Glc}\beta(1-4)\text{-D-Glc}\alpha(1-4)\text{-D-Glc}\beta(1-4)\text{-L-Rhap}\alpha(1-3)]_n$ y con sustituyentes glicerilo y acetilo [30].

En la naturaleza, son variables tanto los tipos de exopolisacáridos como sus niveles de producción (de $270\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ a 76 g L^{-1}) (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los EPSs de interés industrial, producidos por microorganismos eucariotas. Reproducida, con modificaciones, de F. Donot et al. (2012), [22].

MICROORGANISMO	EXOPOLISACÁRIDO	CEPA	SUSTRATO	CONCENTRACIÓN EPS (g L ⁻¹)
Levaduras y hongos filamentosos	Pullulano	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Sacarosa	1,3-52,5
	Schizophyllano	<i>Schizophyllum commune</i>	Glucosa/sacarosa	1,62-8,03
	Galactano	<i>Sporobolomyces</i> sp.	Sacarosa	1-5
	Glucano	<i>Rhodoturula</i> sp.	Glucosa/sacarosa	
Microalgae		<i>Porphyridium cruentum</i>	CO ₂	0,1-0,3
Diatomeas		<i>Amphora holsatica</i>	CO ₂	0,0027

Existen diversos grupos microbianos eucariotas y procariotas productores de exopolisacáridos, pero cabe destacar que son las bacterias las que producen una mayor variedad de moléculas y en cantidades más elevadas (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los EPSs de interés industrial, producidos por microorganismos procariotas. Reproducida, con modificaciones, de F. Donot et al.(2012) [22].

MICROORGANISMO	EXOPOLISACÁRIDO	CEPA	SUSTRATO	CONCENTRACIÓN EPS (g L ⁻¹)
Bacteria	Celulosa	<i>Acetobacter xylinum</i>	Fructosa/glucosa	7-23,6
		<i>Acinetobacter</i> sp.	Etanol/diesel	4,7
	Alginate	<i>Pseudomonas aerugia</i>	Kylosa	0,4
		<i>Azobacter</i> sp.	Glucosa/fructosa	1,1-7,5
	Dextranos y derivados	<i>Leuconostoc</i> sp.	Sacarosa	8,17
	Curdano	<i>Agrobacterium</i>	Glucosa/sacarosa	5,02-76
	Gelano	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Glucosa	30-72
		<i>Streptococcus</i> sp.	Glucosa	5,0-10,0
	Xantano	<i>Xanthomonas campestris</i>	Molassa	53
	Levano	<i>Erwinia</i> sp.	Sacarosa	15
	Otros EPS	<i>Enterobacter</i> sp.	Glucosa	6-18
		<i>Halomonas</i> sp.	Sacarosa/glucosa	1,6-4,5
Cianobacteria		<i>Synechocystis</i> sp.	CO ₂	0,35-0,55

2.2 Biosíntesis de los EPS de las BAL

La mayoría de los EPSs bacterianos se sintetizan intracelularmente y se exportan al medio extracelular como macromoléculas. Hay algunas excepciones conocidas (como levanos y dextranos) cuya síntesis y polimerización ocurre fuera de las células, por la acción de enzimas secretadas y convirtiendo el sustrato en polímero en el medio extracelular [31].

Las vías biosintéticas bacterianas comprenden la captación de sustrato, su incorporación en la vía central y finalmente la síntesis de los polisacáridos. Dependiendo del tipo de sustrato utilizado por la célula, ya sea a través de

transporte pasivo o activo, el metabolito es catabolizado y oxidado a través de la vía periplásmica oxidativa directa. Mientras que esta última vía existe sólo en algunas bacterias, la fosforilación intracelular es ubicua y está presente en todos los organismos [30].

La síntesis de los EPSs requiere la biosíntesis de los precursores activados, que son monosacáridos ricos en energía (azúcares difosfato), principalmente nucleósidos (NDP-azúcares), que derivan de azúcares fosforilados. Los HePs se forman a partir de precursores citoplasmáticos oligosacáridicos que se ensamblan en la membrana celular gracias a un transportador lipídico unido al primer monosacárido. Se ha propuesto que el lípido podría ser un derivado isoprenoide, por analogía con la síntesis de otros EPSs descritos en bacterias Gram-negativas y con el peptidoglicano, ácido lipoteicoico y antígeno-O del lipopolisacárido [32].

Los mecanismos de polimerización, la determinación de la longitud de cadena y la exportación todavía siguen siendo poco conocidos. Sin embargo, la similitud de los productos de los genes implicados en estos procesos, con los que participan en la polimerización y la exportación de los antígenos-O de *E. coli* y el EPS de *Sinorhizobium meliloti*, sugiere que probablemente las BAL utilizan mecanismos similares para la polimerización y la exportación de sus EPSs [33].

En cuanto a los HoPs la mayoría de ellos (α -glucanos y fructanos) son sintetizados a partir de sacarosa a través de la acción de glicansacarasas extracelulares. Las enzimas que sintetizan polímeros de α -glucano solo existen en BAL, mientras que las que sintetizan fructanos están presentes en otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Numerosos genes que codifican glicansacarasas han sido identificados en los cromosomas de los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Algunos de estos genes se expresan constitutivamente, mientras que otros son inducibles por sacarosa [34]. Sólo un gen, denominado glicosiltransferasa *gtf*, es necesario para la biosíntesis de β -D-glucanos en BAL. Este gen está localizado en un plásmido de 35 kb de *P. parvulus* 2.6 o en un plásmido de 5,5 kb en las estirpes IOEB8801, CUPV1 y CUPV22 de *P. parvulus*, en *Lactobacillus diolivorans* G77 y en *Lactobacillus suebicus*

CUPV221 [33]. Este gen codifica la GTF β -glucosiltransferasa, una proteína de membrana, cuya predicción topológica indica que el β -glucano o sus precursores se sintetizan en el citosol [35], y que probablemente la proteína forme un canal para facilitar la secreción del polímero hacia el exterior [36]. Un mecanismo similar ha sido propuesto para la translocación del curdlano hacia el exterior, cuya síntesis es realizada por *Agrobacterium* [37].

Los HePs y los β -glucanos son producidos por glicosiltransferasas que utilizan nucleótidos de azúcares como sustrato. Por otro lado, los α -glucanos y los fructanos son sintetizados por glucansacarasas que son capaces de utilizar la energía del enlace glicosídico de la sacarosa para unir moléculas de glucosa o de fructosa a la cadena del polisacárido creciente. Además, estas enzimas pueden sintetizar HePs cuando utilizan como sustrato la maltosa y la isomaltosa [27]. Las enzimas que sintetizan α -glucanos se llaman glucansacarasas (GSs) y aquellas que sintetizan fructanos se denominan fructansacarasas (FSs). A diferencia de las glicosiltransferasas, cuyas características serán discutidas más adelante, evolutivamente las GSs y las Fs son transglicosidasas, estructural y mecánicamente relacionadas con las glicosil hidrolasas (GHs) [38]. Aunque las enzimas GSs y FSs catalizan reacciones muy similares utilizando el mismo sustrato, no muestran grandes similitudes en su secuencia de aminoácidos y son estructuralmente muy diferentes. En cuanto a la secuencia de aminoácidos, estas enzimas se componen de 4 dominios estructurales desde el extremo N-terminal al C-terminal: un péptido señal involucrado en la secreción de la enzima; un dominio N-terminal variable de función desconocida; un dominio catalítico conservado que comprende el sitio de unión a la sacarosa y un dominio de escisión de sacarosa. Además, en las FSs existe también un sitio de unión de iones de calcio y un dominio C-terminal, que se compone de una serie de repeticiones en tándem que se cree que participan en el control del tamaño del producto, así como en la unión del α -glucano (en las GSs), o en el anclaje a la pared celular (en las FSs) [39].

Las glicosiltransferasas son enzimas ubicuas en procariotas y eucariotas. Están involucradas en la biosíntesis de oligosacáridos, polisacáridos y glicoconjugados (por ejemplo lipopolisacáridos y glicoproteínas). Estas enzimas son responsables de la

biosíntesis de enlaces glucosídicos mediante la transferencia de un residuo de azúcar desde moléculas donadoras activadas hasta moléculasceptoras específicas. Los sustratos donadores de azúcar son principalmente nucleótidos de azúcares, sin embargo también pueden ser nucleósidos de azúcares monofosfato, azúcares fosfato unidos a lípidos y azúcares 1-fosfato. Generalmente los aceptores son otros azúcares, pero también pueden ser lípidos, ácidos nucleicos, etc. Además, las reacciones que conducen a la formación de un nuevo enlace glicosídico pueden tener como resultado dos productos estereoquímicos posibles, ya que el producto puede retener (α -glicosiltransferasas) o invertir (β -glicosiltransferasas) la configuración anomérica del sustrato donador [27].

La biosíntesis de HePs por las BAL implica la intervención de varias enzimas para la producción de las unidades repetitivas: una glicosiltransferasa cebadora que transfiere el primer azúcar a partir de azúcar 1-fosfato a un lípido aceptor fosforilado y una o más α -glicosiltransferasas o β -glicosiltransferasas que añaden secuencialmente nuevos azúcares procedentes de azúcares-nucleótidos a la unidad repetitiva en formación. Existen ejemplos caracterizados de estas enzimas, como EpsE, una fosfo-galactosiltransferasa de *S. thermophilus* Sfi6 y EpsD una fosfo-glucosiltransferasa de *L. lactis* B40 subsp. *cremoris*, que son glicosiltransferasas cebadoras [32].

2.3 Funciones y aplicaciones de los EPSs microbianos

Existe una gran diversidad estructural en los polisacáridos, de forma que cada uno de estos polímeros posee características propias dependiente de su estructura química y de su estructura tridimensional.

Una vez secretados al exterior, en muchos casos los EPSs se agregan para formar estructuras complejas. Así, estos biopolímeros afectan a la forma en que los microorganismos interactúan con el ambiente externo [22], y son capaces de relacionarse con otras biomoléculas participando en procesos de interacción bacteria-célula eucariota y bacteria-bacteria [40]. Además de jugar un papel en la adhesión, la formación de biopelículas es importante en la adaptación de las

bacterias a las condiciones físico-químicas del medio ambiente. Así, los microorganismos se asocian a menudo creando una biopelícula de elevada densidad celular, el glicocálix, que está formado mayoritariamente por EPSs, siendo estos polímeros esenciales para la constitución de la misma y para su estabilidad a través de las interacciones entre las cadenas del polisacárido [41]. Otro papel importante de los EPSs es ayudar a la protección del microorganismo en su entorno, ya que el alto contenido en agua alrededor de los EPSs, asegura mayor resistencia del microorganismo frente a la desecación y la depredación por protozoos. Asimismo al contener alguno de ellos grupos amonios, ayudan a los microorganismos a capturar minerales esenciales y nutrientes; así como a degradar metales e iones [22].

Muchos microorganismos, algunos de ellos patógenos, son utilizados en la industria para la producción de EPSs. Miembros de los géneros *Xanthomonas*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, que producen respectivamente xantano, dextrano, gelano y curdlano, son los más conocidos y explotados. Actualmente, los EPSs producidos por BAL, que son aceptadas como GRAS, constituyen uno de los grupos de biopolímeros más adecuados para la industria alimenticia [28].

Los α -glucanos producidos por diferentes organismos como las bacterias y los hongos, se utilizan en medicina para reducir la viscosidad de la sangre, o como antimicrobianos [34], y en la industria de los alimentos, como espesantes y gelificantes, además de aditivos en refrescos y helados [42].

Los β -glucanos tienen potenciales efectos beneficiosos sobre la salud del hombre y los estudios realizados indican que poseen propiedades anti-tumorales, anti-diabéticas, disminución de las infecciones, reducción del colesterol sérico [43], efecto bifidogénico [44], reducción de marcadores anti-inflamatorios y de grasa visceral, así como propiedades inmunomoduladoras [45].

Los HePs tienen un papel importante en la industria alimenticia y farmacéutica. El *xantano* se agrega a los alimentos para controlar la reología del producto final. El polímero produce un gran efecto sobre propiedades como la textura, liberación de

aroma y apariencia, que contribuyen a la aceptabilidad del producto para su consumo. También se utiliza como aditivo para añadir elasticidad a las masas hechas de harinas sin gluten en los alimentos especiales para celíacos [46]. Como un aditivo alimentario, la *goma de gelano* se usa como espesante, emulsionante y estabilizador. Además, numerosas casas comerciales lo producen para su uso en laboratorio, como sustituto del agar o de otros espesantes [47].

3. Probióticos

El término probiótico fue introducido en la década de los 60 del siglo XX, por Lilly y Stillwell como “un factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros microorganismos”. Una definición más reciente y precisa describe a los probióticos como: suplementos dietéticos microbianos, viables, seleccionados; que, cuando son administrados en cantidades adecuadas y en forma sostenida en el tiempo, benefician al organismo receptor humano a través de sus efectos en el tracto intestinal [48]. También, la Organización Mundial de los Alimentos y Agricultura (FAO, “*Food and Agriculture Organization*”) ha adoptado la definición de probióticos como “microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador” [49].

Las bacterias probióticas por excelencia son las BAL, sobre todo miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*; algunas de ellas utilizadas en la industria alimenticia, tanto directamente, como con sus metabolitos [50]. Las BAL, como probióticos, son utilizadas en alimentos para proporcionar una amplia variedad de beneficios saludables, no sólo a efectos locales ligados a su capacidad de colonizar la mucosa intestinal sino también a efectos distales ligados a su actividad promotora de la inmunidad celular y humoral. Entre algunos de los efectos científicamente probados destacan, la mejora de la digestibilidad de la lactosa, la producción de sustancias antimicrobianas (ácidos orgánicos, ácidos grasos, bacteriocinas, etc.), la modulación de la respuesta inmune y la influencia en la actividad metabólica y la mejora en algunas patologías gastrointestinales. Su función más importante es contribuir a la reconstitución y equilibrio de la microbiota intestinal normal, después de alteraciones causadas entre otras, por la diarrea, terapia con antibióticos,

radioterapia e infecciones bacterianas. Sin embargo, para producir un efecto beneficioso en la salud del hospedador, estos microorganismos deben ser administrados en cantidades elevadas. Así, la cantidad de bacterias probióticas sugerida, para poder ejercer sus efectos beneficiosos, debería estar en el rango de 10^8 - 10^9 bacterias vivas en el intestino delgado, para lo que se necesitaría un consumo diario de aproximadamente 10^9 - 10^{10} bacterias [51, 52].

4. Prebióticos, oligosacáridos y polisacáridos

A lo largo de las últimas décadas se han acumulado un gran número de evidencias que demuestran que existe una relación directa entre la población microbiana intestinal y la salud del hospedador; y por esta razón, la búsqueda de alternativas que permitan mejorar la actividad metabólica del colon se ha convertido en una prioridad. A mediados de los años 90 del siglo XX, Gibson y Roberfroid (1995) introdujeron el concepto de prebióticos definiéndolos como “compuestos capaces de asegurar la supervivencia de la microbiota beneficiosa en el tracto gastrointestinal”; abriendo así la posibilidad de la utilización de un nuevo tipo de terapia coadyuvante para afrontar numerosos problemas de salud [53]. Su desarrollo constituye un área de investigación reciente, y tratándose de productos para el consumo humano, el término prebiótico se encuentra en continuo desarrollo. Constantemente se proponen nuevas fuentes de potenciales prebióticos, de manera que es imprescindible disponer de normativas o criterios claros a la hora de introducir una nueva molécula en un listado de productos admitidos [54].

Los prebióticos son primordialmente hidratos de carbono de cadena corta, que resisten la digestión y la absorción en el esófago, estómago e intestino delgado, y que finalmente son parcial o totalmente fermentados en el intestino grueso por la microbiota beneficiosa. Por este motivo resultan beneficiosos y seguros para la salud humana [53, 55] y son componentes de los alimentos funcionales. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* forman parte del protocolo para elegir la dosis de estas sustancias no digeribles, su tolerancia en el ambiente intestinal y su capacidad para desplazar el crecimiento de los patógenos, aumentando, por tanto, el crecimiento de ciertas bacterias beneficiosas del microbioma intestinal como *Lactobacillus* y

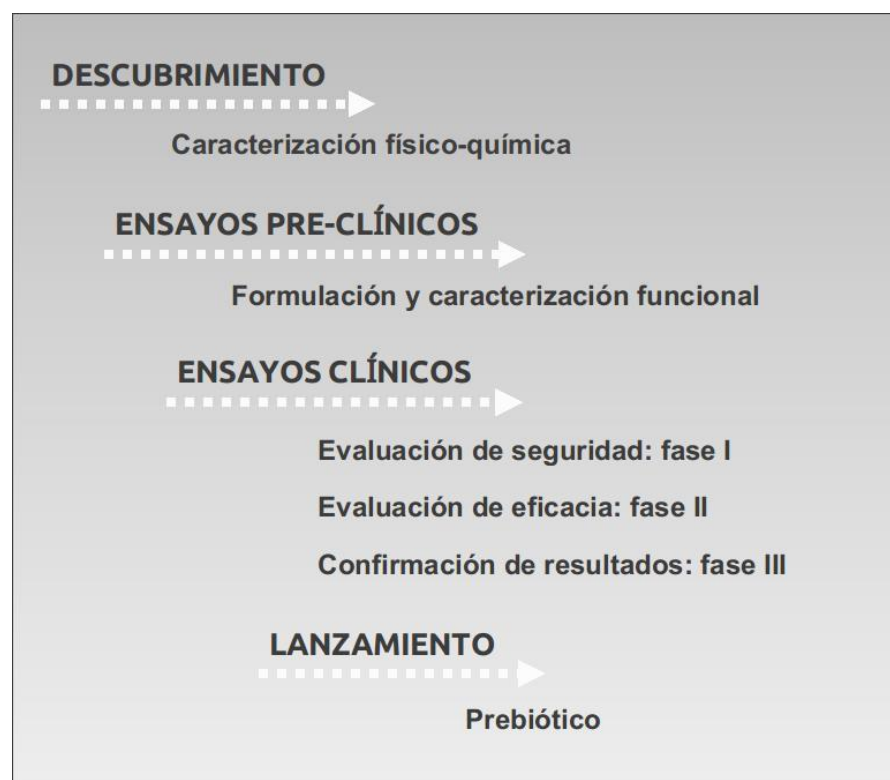
Bifidobacterium; lo que se conoce como efecto bifidogénico [48]. Los prebióticos en sí no son un componente nutritivo para el hospedador, ya que no están involucrados en procesos metabólicos del organismo. Sin embargo las enzimas secretadas por la microbiota son capaces de fermentarlos y descomponerlos en compuestos asimilables por el hospedador, como AGCC. A su vez, la producción de estos AGCC (como propionato y butirato) conlleva una acidificación del pH que provoca la solubilización y metabolización de minerales como calcio, magnesio, hierro y zinc, que de esta forma resultan disponibles para el hospedador [56]. Otros efectos beneficiosos colaterales descritos en la bibliografía, son la síntesis de vitaminas y aminoácidos, por parte de bacterias beneficiadas metabólicamente por los compuestos prebióticos. En consecuencia, resulta evidente que los microorganismos estimulados ejercen una función importante en el individuo al que colonizan [57].

De hecho, la FAO los ha definido en un informe técnico del año 2007 como: “componente alimenticio no viable, que confiere un beneficio saludable para el hospedador, asociado a la modulación de la microbiota” [58]. Además, es fundamental conocer y controlar el origen, pureza, estructura química, dosis y forma de administración de las sustancias catalogadas como prebióticos; con el objeto de corroborar que su efecto sea el responsable de la modulación de la microbiota del hospedador: principalmente del tracto gastrointestinal, y secundariamente de la piel y de la vagina. Por ello, la FAO en el informe antedicho describe una serie de pasos encaminados a la aceptación de una sustancia como un nuevo prebiótico (fig. 2).

Resumiendo, un prebiótico debe reunir cuatro características básicas e importantes:

- Ser un componente: molécula que se pueda caracterizar químicamente. En la mayoría de los casos, será un componente para uso alimentario.
- Ser beneficioso para la salud: pero no por su absorción en el torrente sanguíneo ni por acción directa en el hospedador; sino por su capacidad de ser metabolizados por la microbiota intestinal y proporcionar metabolitos favorables para a la dieta del hospedador.

- Ser modulador: su presencia es capaz de cambiar la composición o la actividad de la microbiota en el hospedador. Los mecanismos moduladores podrían incluir: entre otros, fermentación o bloqueo de receptores.
- Ser seguro: para poder ser incluido en un alimento funcional el compuesto tiene que poseer un historial de seguridad para el hospedador. Dependiendo del lugar de comercialización (en los Estados Unidos de Norteamérica o en Europa) debe cumplir con los requisitos recogidos en el documento GRAS elaborado por la FDA, o en el documento QPS elaborado por la EFSA.



▪ Figura 2. Pasos establecidos por la FAO para el establecimiento de sustancias como unos nuevos prebióticos.

Finalmente, es necesario resaltar que las fibras alimenticias también son carbohidratos no digeribles por el hospedador y que sirven como sustrato a los microorganismos presentes en el colon, generando energía, metabolitos y micronutrientes esenciales para el hospedador, sin embargo no tienen efecto bifidogénico [58]. Este grupo incluye polisacáridos estructurales de las plantas como la celulosa, la peptina y oligosacáridos como los contenidos en la soja.

4.1 Clasificación de los hidratos de carbono prebióticos

Estos prebióticos pueden clasificarse en función de sus características fisicoquímicas, origen o grado de polimerización (tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los prebióticos según su origen. FOS (fructo-oligosacárido); XOS (xylo-oligosacárido). *Reproducido, con modificaciones, de M. Ramanamma (2012) [59].*

CLASIFICACIÓN	ORIGEN/PROCESO DE FABRICACIÓN
DISACÁRIDOS	
Lactulosa	Síntesis a partir de lactosa
Lactitol	Síntesis a partir de lactosa
OLIGOSACÁRIDOS	
FOS	Vegetales, hidrólisis de cereales
XOS	Plantas
Galacto-oligosacáridos	Síntesis a partir de lactosa
POLISACÁRIDOS	
Inulina	Extracto de legumbre, verdura y cereales
Almidones resistentes	Extracto de legumbre, verdura y cereales
α -glucanos	Extracto de cereales, hongos y extraído de bacterias
β -glucanos	Extracto de cereales, hongos y extraído de bacterias

Algunos prebióticos se pueden obtener a partir de la degradación enzimática de polisacáridos como los xilanos, la inulina y los almidones; así como por síntesis enzimática a partir de azúcares simples como la lactosa y la sacarosa, catalizada por enzimas como las glicosiltransferasas y las glicosidasas [30, 60, 61]. Así, en el caso de los prebióticos naturales, estos se ingieren de forma cotidiana en las partes comestibles y estructurales de plantas y, en pequeñas cantidades, en la leche humana y en el calostro animal [61-63].

5. Las BAL productoras de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2

Las bacterias productoras de los EPSs poseen un fenotipo filante o mucoso, característica que se detecta en cultivos líquidos de bacterias. Dado que el determinante genético del carácter mucoso se expresa a veces en un plásmido inestable, la variante no mucosa puede ser detectada tras muchos pases en cultivo [64].

En el caso de las BAL productoras de β -glucano, la glicosiltransferasa GTF es la enzima que produce el polímero y experimentos *in vitro* han mostrado que, la proteína sintetiza el (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2 utilizando la UDP-glucosa como sustrato [36, 65]. El hecho de que la expresión heteróloga de la GTF en otras BAL lleve a la síntesis y secreción del mismo β -glucano en las bacterias portadoras, sugiere que este polímero no requiere transportadores específicos para ser liberado al espacio extracelular [36, 66]. La presencia de cuatro regiones transmembrana potenciales en el extremo C-terminal de la glicosiltransferasa GTF, y dos más en su extremo N-terminal, sugiere que la enzima forma un poro de membrana para facilitar la extrusión del polímero [35].

Tal y como se ha citado anteriormente, existen sólo algunas especies bacterianas capaces de producir el (1-3)- β -D-glucano ramificado en posición O-2, entre las que se encuentra la estirpe *P. parvulus* 2.6 (aislada de sidra natural ahilada) [14], que porta el gen *gtf*. Los estudios funcionales de ésta y de otras cepas naturales, así como de cepas recombinantes productoras del gen *gtf* [33] junto con análisis de la actividad del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2 [44] sugieren que la cepa 2.6 podría ser una bacteria probiótica y que el polímero que sintetiza es un prebiótico con un posible efecto inmunomodulador. Estos resultados constituyen los antecedentes que han promovido el desarrollo de esta tesis doctoral y por ello se describirán parcialmente en este apartado y en las introducciones de los capítulos 1 y 2.

El polímero producido por *P. parvulus* 2.6 posee una estructura con una cadena principal igual a los polisacáridos aislados de avena, que son glucanos β (1-3) con ramificaciones en β (1-2) (fig. 3) y que han demostrado ser eficaces en la reducción del colesterol sérico [21]. De hecho, en un estudio con 56 individuos, Mårtensson *et al.*, (2005), [43] mostraron que alimentos basados en avena, y fermentados con *P. parvulus* 2.6, tenían un efecto hipocolesterolémico y provocaban un incremento de bifidobacterias detectadas en heces humanas. Por otra parte, un estudio llevado a cabo en ratas ha demostrado, que tras la ingesta de alimentos que contienen *P. parvulus* 2.6 productora de EPS y la estirpe isogénica no productora, los dos tipos de bacterias superaron el paso por el tracto gastrointestinal (TGI) *in vivo*

comprobandose una mayor adhesión al epitelio de la estirpe productora (atribuible a la presencia del EPS) [67]. La implicación de este β -glucano en la capacidad de colonización bacteriana de distintas estirpes de *P. parvulus* y *Lactobacillus* había sido detectada previamente en un modelo *in vitro* de adhesión a células epiteliales intestinales Caco-2 [67, 68]. También, la resistencia al estrés del TGI se había demostrado previamente *in vitro*, y de hecho ambas cepas (productora y no productora) mostraron el mismo patrón de resistencia al estrés gástrico, lo cual indicó que la presencia del EPS no confiere a *P. parvulus* 2.6 una ventaja para la supervivencia en el tracto digestivo humano. Stack *et al.* (2009), demostraron, asimismo, que la expresión heteróloga del gen *gtf* de *P. parvulus* 2.6 en *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, mejoraba la supervivencia de la estirpe al estrés del TGI y al estrés tecnológico, con respecto a la cepa original, debido a la presencia del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2 [66].

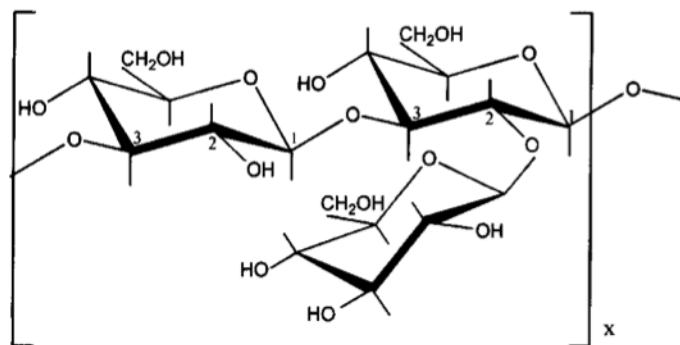


Figura 3. Estructura del (1-3)- β -D glucano de *P. Parvulus* 2.6.

Puesto que los EPSs son conocidos por formar biopelículas, diversos autores han investigado la relación entre la producción del EPS y la capacidad de colonizar el entorno intestinal mediante modelos *in vitro*. Sin embargo, dichos estudios no contemplan la influencia que los EPSs exógenos podrían tener sobre el nivel de adhesión de otras especies microbianas; como es el caso de la síntesis del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2, que incrementa cuatro veces la adhesión de *L. plantarum* WCFS1 a células Caco-2 [44].

De la misma manera, se han estudiado los posibles efectos como prebióticos del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2, en la producción de alimentos fermentados a base de avena, yogurt y como componente de bebidas funcionales, utilizando estirpes productoras del EPS P que incrementaron las propiedades tecno-funcionales de las propias BAL [64]. Además, Russo *et al.* (2011) estudiaron el potencial prebiótico del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2 sobre el crecimiento de tres bacterias probióticas: *L. plantarum* WCFS1, la estirpe recombinante *L. plantarum* WCFS1 (portadora del gen *bglT* y que sobre-expresa la glicosidasa BglT) y *L. acidophilus* NCFM. Dichos estudios confirmaron que la adición del EPS al medio de cultivo provocaba un incremento de la tasa de crecimiento de las mismas, siendo este efecto más pronunciado en la estirpe que sobre-expresa BglT sugiriendo que la utilización del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2, en la que podría estar implicada la BglT, modula positivamente el crecimiento de bacterias probióticas [44].

6. El sistema inmune humano

La función global del sistema inmune es prevenir o limitar la infección por microorganismos. Este sistema puede distinguir entre organismos patógenos y no patógenos, a través del reconocimiento de diferentes señales y cuando lo hace genera una respuesta para solucionar el problema. Si la respuesta inmune no es conveniente, aparecen problemas como la infección por microorganismos patógenos. Por otro lado, cuando el sistema inmune se activa sin que exista un peligro real, o si no se desactiva cuando pasa el peligro, aparecen otros problemas, como reacciones alérgicas o enfermedades autoinmunes [69].

El sistema inmune es complejo e incluye numerosos tipos celulares que circulan por el torrente sanguíneo llegando a numerosos órganos, o bien residen en tejidos específicos. Cada tipo celular juega un papel único, con diferentes formas de reconocer los problemas, de comunicarse con otras células, y de llevar a cabo sus funciones. Todas las células inmunes proceden de precursores de la médula ósea y se transforman en células maduras a través de una serie de cambios que pueden

ocurrir en diferentes partes del cuerpo humano: la piel, las glándulas adenoides, las amígdalas, la médula ósea, el torrente sanguíneo, el timo, el bazo, las mucosas y el sistema linfático (fig. 4); destacando como los principales órganos del sistema inmune:

- **La médula ósea:** contiene células madre que pueden generar diversos tipos celulares. Las células madres progenitoras mieloides son los precursores de células del *sistema inmune innato* (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, monocitos, células dendríticas y macrófagos), importantes en la respuesta primaria a la infección. Las células madre progenitoras linfoides, se transforman en células del *sistema inmune adaptativo* (células B y T) que son responsables de estructuras de respuesta a microorganismos específicos, basados en encuentros previos (memoria inmunológica). Las células asesinas (NK, “*natural killer*”) derivan a su vez de progenitores linfoides y comparten características de ambas células, respuesta innata y adaptativa.
- **El timo:** es un pequeño órgano localizado en el hombre entre los pulmones dónde maduran los linfocitos T.
- **El sistema linfático:** está constituido por una red de vasos y tejidos compuestos por linfa, un fluido extracelular y órganos linfoides como los ganglios linfáticos. Este es un sistema de comunicación entre tejidos y el torrente sanguíneo. Las células inmunes se transportan a través de dicho sistema y convergen en los ganglios linfáticos, que se encuentran distribuidos por todo el cuerpo. Estos ganglios son un centro de comunicación donde las células del sistema inmune capturan información proveniente del cuerpo.
- **El bazo:** es un órgano localizado detrás del estómago y no está directamente conectado con el sistema linfático. Sin embargo, es importante para el procesamiento de la información proveniente del torrente sanguíneo. Las células inmunes son abundantes en áreas específicas del bazo y ante el reconocimiento de patógenos en sangre, se activan y responden adecuadamente.
- **Las mucosas:** están localizadas en las superficies externas o internas del cuerpo. Son los puntos de entrada primaria para patógenos y por ello en las mucosas existen centros especializados inmunes, estratégicamente localizados en tejidos como el tracto respiratorio y el intestino. Por ejemplo, las placas de Peyer son

áreas importantes en el intestino delgado donde las células inmunes pueden acceder a efectores presentes en el tracto gastrointestinal.

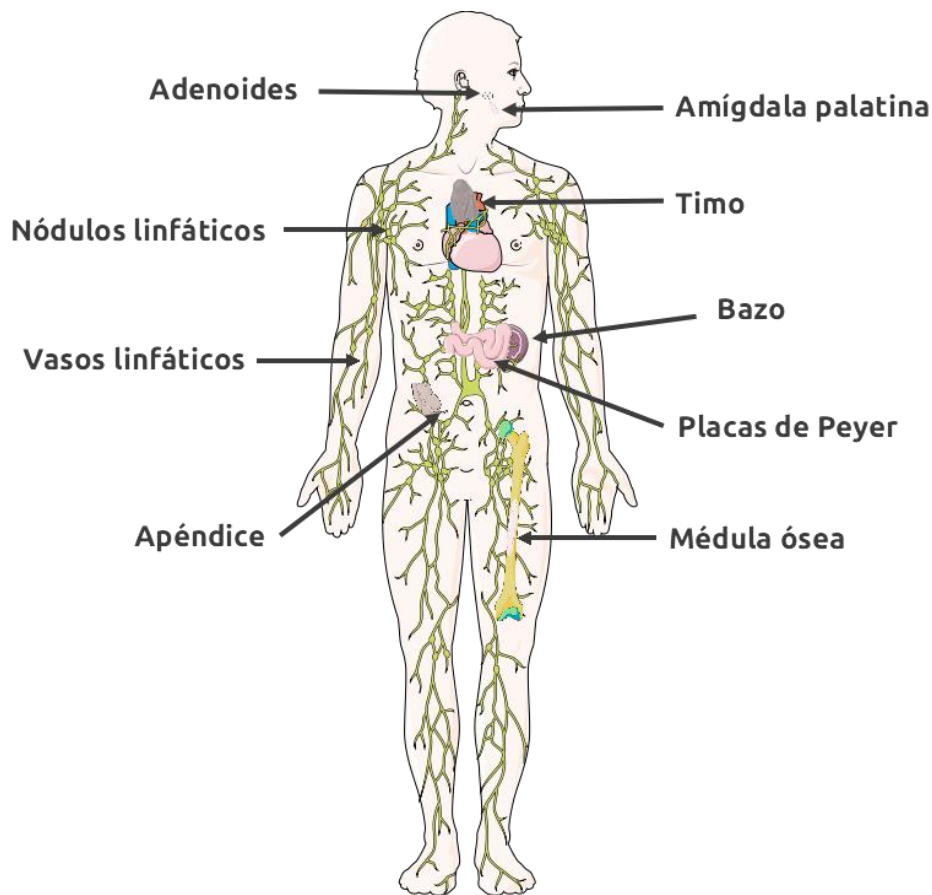


Figura 4. Sistema linfático y los principales órganos/centros inmunes en el hombre.

Como se ha avanzado, la defensa del hospedador frente a microorganismos patógenos está basada en una respuesta con dos componentes: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa o adquirida, que si bien son diferentes, trabajan de forma coordinada y sinérgica [70].

6.1 La inmunidad innata

La inmunidad innata conforma la primera línea de defensa frente a infecciones; siendo capaz de producir una respuesta rápida frente a un patógeno sin que sea necesaria la inducción o maduración de los linfocitos. Este tipo de inmunidad está mediada por células que fagocitan y destruyen a los patógenos; coordinando a su

vez la respuesta adquirida a través de la liberación de mediadores inflamatorios y citoquinas como el "*tumor necrosis factor*" (TNF- α) y la interleuquina 1 (IL-1).

Los principales tipos celulares involucrados en la respuesta inmune innata son: fagocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas (CDs) (fig. 5).

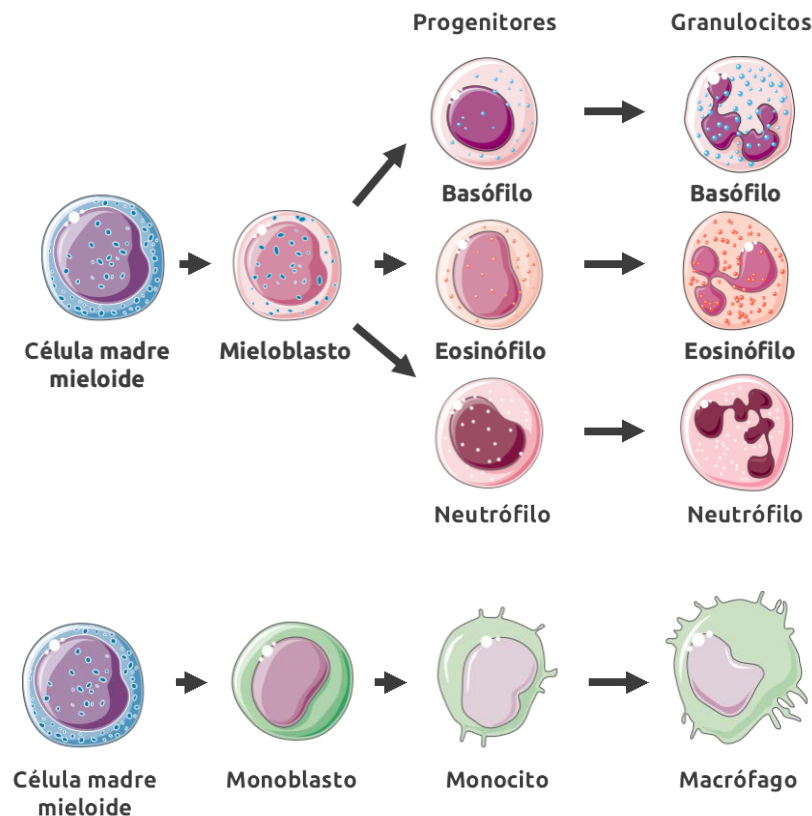


Figura 5. Diferenciación de las células del sistema inmune innato. Los progenitores de granulocitos y monocitos derivan de células precursoras mieloideas comunes, y en la etapa final de su diferenciación, se produce la salida de la médula ósea hacia la sangre. Tras el reclutamiento en tejidos periféricos, los monocitos pueden diferenciarse en células dendríticas o macrófagos.

A nivel evolutivo y filogenético, la inmunidad innata es más antigua que la adaptativa (que sólo aparece en animales vertebrados).

La respuesta inmune innata se basa en el reconocimiento de numerosos productos microbianos; de forma que si se quiere que el sistema sea funcional, tiene que disponer de un mecanismo de reconocimiento de patógenos para diferenciar los "elementos propios" [70, 71]. Esta función se mantiene gracias a la sensibilidad y especificidad en el reconocimiento de patrones específicos microbianos. Así, ante el

reto de discriminar numerosos patógenos con un número restringido de receptores, aparecen los: receptores de reconocimiento de patrones (PPR, “*Pattern Recognition Receptors*”). Estos receptores reconocen estructuras conservadas, y por tanto sometidos a pocas mutaciones, de microorganismos patógenos que no están presentes en células eucariotas. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, “*Pathogen-Associated Molecular Patterns*”) [72], incluyen componentes de la pared celular de bacterias, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ácidos teicoicos y otros componentes de hongos, levaduras y protozoos.

Los PRR pueden ser de 2 tipos: (i) aquellos que median en mecanismos de fagocitosis y (ii) los que inducen vías de activación de mediadores pro-inflamatorios. Los primeros estudios sobre estos receptores fueron realizados en la mosca *Drosophila melanogaster* (carente de inmunidad adquirida) y dieron lugar al descubrimiento de una familia de PRR denominada: “*Toll-Like Receptors*” (TLRs) [73]. La unión de un ligando a estos receptores de membrana provoca una activación de la cascada intracelular de proteínas quinasas, que produce la translocación de diversos factores de transcripción del citoplasma al núcleo de la célula. El principal factor de transcripción que resulta activado es el NFkB, que a su vez estimula la producción de numerosos mediadores y citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8 o IL-12. Al mismo tiempo, estimula la producción de moléculas que serán necesarias para la activación de los linfocitos T, por parte de las células presentadoras de antígeno, ya que este tipo de células, fundamentalmente macrófagos, fagocita el microorganismo patógeno y presenta, en su superficie, los antígenos resultantes a los linfocitos T; iniciando de esta manera la respuesta adaptativa, que confiere una protección inmune a largo plazo. De esta forma se establece la relación entre la detección del patógeno, inmunidad innata e inmunidad adquirida [74].

Los TLRs juegan un papel importante en la inmunidad innata. En humanos, los receptores de esta familia mejor caracterizados son el TLR-2 y el TLR-4. El TLR-2 reconoce diferentes componentes celulares de bacterias Gram-positivas, micobacterias y levaduras, mientras que el TLR-4 es el receptor del LPS de las bacterias Gram-negativas. El patrón de expresión de los TLRs varía según el tipo

celular y el tejido estudiado, no estando restringido a tejidos linfoides. Los TLRs conocidos hasta el momento se expresan en monocitos, neutrófilos, células NK, células B, CD, células endoteliales y también en células epiteliales intestinales. El reconocimiento de los PAMPs por los TLRs produce la activación celular, y en el caso de células presentadoras de antígenos como las CDs, induce a su vez su maduración y la expresión de moléculas de superficie, que serán las que determinen la potencia y la polarización de las células T, en relación al perfil de citoquinas [75].

6.2 La Inmunidad adquirida.

El organismo ha desarrollado otro tipo de inmunidad diferente a la innata, que es antígeno específica y genera memoria inmunológica, induciendo, en consecuencia, una defensa duradera, que a su vez ayuda a proteger las superficies mucosas. En esta inmunidad, adaptativa o adquirida, juegan un papel importante los linfocitos B y T efectoras (fig. 6). Las células efectoras B son las células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Igs), y realizan su acción mediante la inmunoexclusión e inmunoeliminación de los antígenos por los anticuerpos IgGs e IgMs, a nivel sistémico; e IgAs secretoras, producidas localmente a nivel intestinal.

La inmunidad celular es una forma de respuesta inmunitaria de selección natural mediada por los linfocitos T. Según las moléculas co-estimuladoras que se expresen en la superficie de las células presentadoras de antígeno, puede polarizarse a hacia un perfil Th1 (si predomina la secreción de citoquinas como TNF- α y el interferón γ (IFN γ), que activan a los macrófagos e inducen mecanismos citotóxicos), o hacia un perfil Th2 (si se inducen las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, que median en la producción de IgEs, en la activación de los eosinófilos participando en reacciones de tipo alérgico). El balance entre estos dos perfiles depende en parte de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias por los linfocitos T reguladores activados, y también por las células presentadoras de antígeno, fundamentalmente las CDs [76].

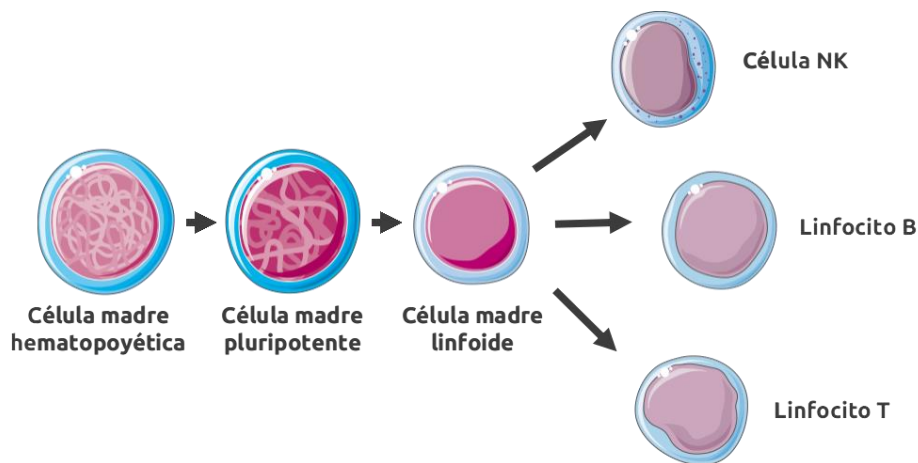


Figura 6. Diferenciación de las células del sistema inmune adquirido. Los progenitores hematopoyéticos son las células encargadas de la formación de todos los elementos celulares de la sangre. Cuando se diferencian a progenitores linfoides, dan origen a los linfocitos T (previa maduración en el timo), linfocitos B y células NK.

7. El sistema inmune intestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) es un sistema de órganos responsables de consumir, digerir y absorber nutrientes y finalmente expulsar desechos (fig. 7).

El TGI está constituido por el estómago y los intestinos, presentando una longitud total aproximada de unos 9 metros. Pero en una concepción más amplia, el sistema digestivo está compuesto por, el hígado, el páncreas y la vesícula biliar, existiendo además otros componentes con un papel importante en la digestión y por tanto en el sistema digestivo, como son las bacterias que colonizan el TGI.

El intestino es la zona del cuerpo donde, desde el nacimiento, existe un mayor estímulo antigénico y que se mantiene de forma constante por el continuo contacto con los antígenos procedentes de alimentos y con los elementos de la microbiota intestinal normal. Se considera la puerta de entrada al resto del organismo, por lo que al mismo tiempo es muy vulnerable. Tiene una superficie de 400 m² formada por enterocitos recubiertos por vellosidades, o células epiteliales. Nada más nacer, el individuo desarrolla mecanismos para mantener la mucosa intestinal íntegra y activa, e incorporar una microbiota normal y estable [77, 78].

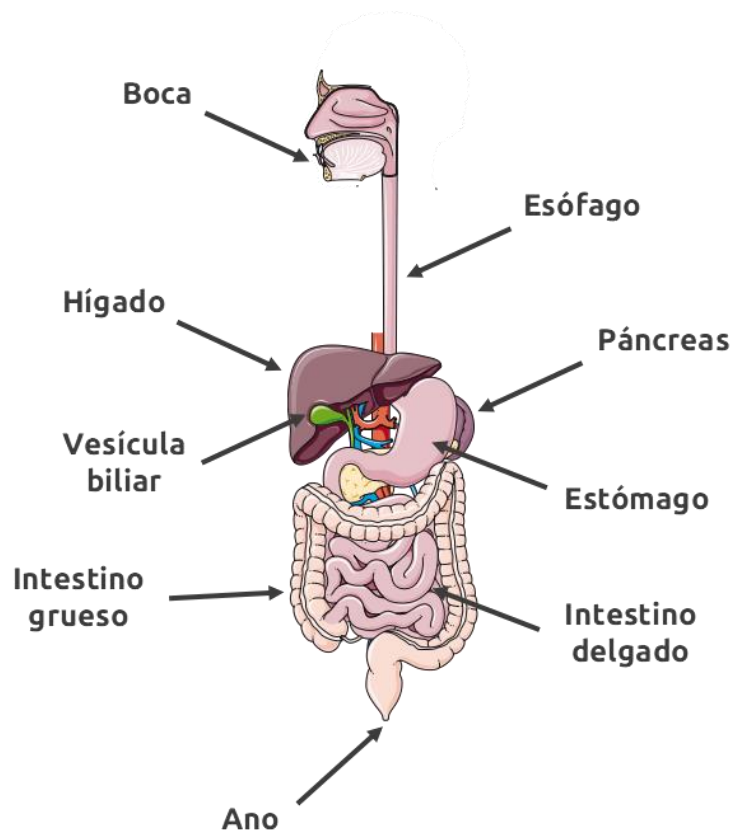


Figure 7. Sistema digestivo humano. Se indican los diversos órganos implicados en este sistema.

El *tejido linfoide* que se encuentra asociado a la mucosa intestinal (GALT, “*Gut Associated Lymphoid Tissue*”), constituye la mayor parte del tejido linfoide del organismo. Existen diferentes compartimentos fisiológicos en los que se producen las funciones inmunes dentro del intestino (fig. 8): en los folículos o placas de Peyer, (como agregados), o en la mucosa y epitelio intestinal de forma difusa (linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia). Las placas de Peyer se encuentran en el intestino delgado agrupadas como cinco o más folículos, mientras que en el colon se encuentran como folículos aislados. Cada folículo tiene una zona de epitelio especializado asociado (células M), carente de criptas o vellosidades, encargado de transportar los antígenos hasta las células del sistema inmune [79-81].

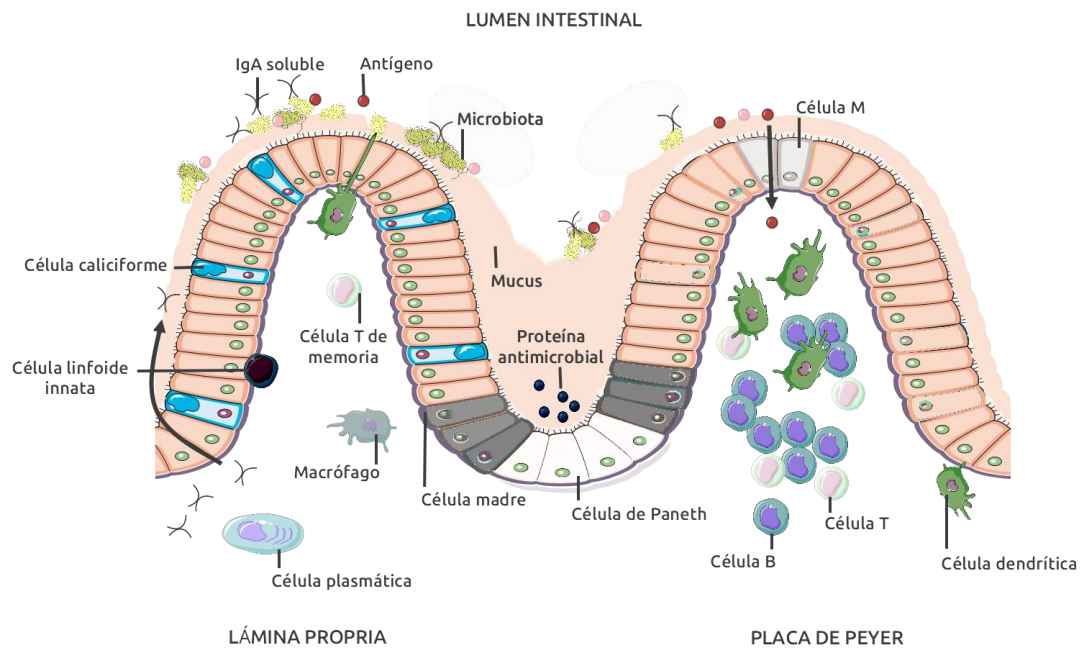


Figura 8. Inmunidad intestinal. Las placas de Peyer contienen células T, células B y CDs y funcionan como ganglios linfáticos: lugares en los que las células T y B son estimuladas para ejercer sus funciones efectoras. Las células M se encargan de transportar antígenos del lumen a las CDs subyacentes, estimulando a las células T vecinas y proporcionando antígenos solubles para las células B, necesarios para que se desarrollen en células maduras y células plasmáticas. Las placas de Peyer constituyen una de las principales zonas en las que se forman células T reguladoras. *Adaptado de Morgan [82].*

La superficie de la mucosa intestinal contiene una gran cantidad de las IgAs secretoras (diferentes a las del flujo sanguíneo) responsables de la eliminación de patógenos. Se caracterizan por ser resistentes a la proteólisis y por no inducir inflamación. Así, todas las evidencias hasta el momento, sugieren que el sistema inmune intestinal responde activamente a los antígenos alimentarios y a la microbiota normal sin inducir enfermedades, en lo que se denomina inflamación fisiológica, caracterizada por un perfil Th1 de citoquinas, con niveles elevados de IL-12 [83, 84], que favorece el desarrollo del sistema inmune humoral y celular. De esta manera, la interacción entre el sistema inmune intestinal y la microbiota bacteriana mantiene una activación del tejido linfoide asociado a la mucosa a lo largo de toda la vida.

7.1 La tolerancia inmunitaria intestinal

Se define como “la respuesta fisiológica a los antígenos alimentarios y a la microbiota intestinal mediante la inducción de un estado específico de no respuesta inmunológica” [85].

La comprensión de la capacidad del sistema inmune para encontrar un equilibrio entre la tolerancia y la inmunidad protectora, sigue siendo uno de los principales desafíos de la inmunología. A diario se produce un contacto íntimo entre antígenos exógenos y las células que componen el sistema inmune del intestino, junto con más de 150-190 g de proteínas procedentes de la microbiota. El fenómeno de la tolerancia intestinal fue detectado en 1946 por Chase, demostrando que la alimentación con un antígeno provocaba "falta de respuesta inmunológica". Esta inducción activa de una respuesta inmune regulada frente a los antígenos intestinales se define como tolerancia oral. El establecimiento de esta tolerancia tiene implicaciones que regulan la respuesta inmune sistémica en todo el cuerpo, incluyendo reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado, la proliferación de linfocitos y la formación de anticuerpos. Hay evidencias de que este fenómeno ocurre en el intestino, evitando, por ejemplo, la inflamación crónica resultante de la reactividad inmune excesiva frente a proteínas presentes en los alimentos [86].

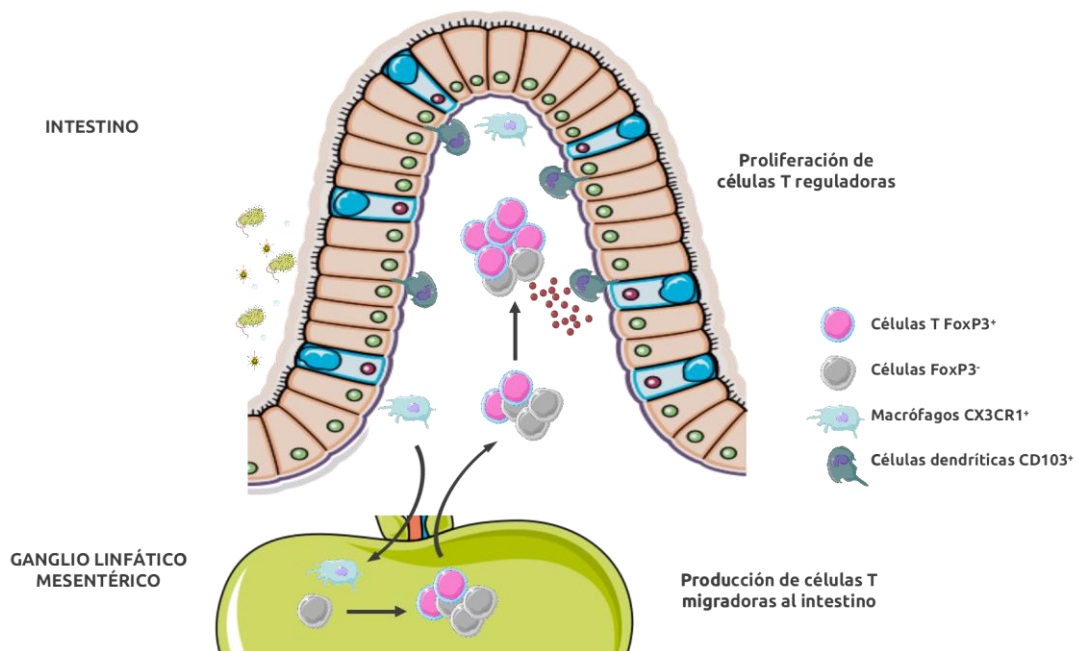


Figura 9. Tolerancia inmune intestinal. Las células T reguladoras FoxP3⁺ median la tolerancia oral y, para ello, se requiere que estas células se dirijan al intestino para permitir la expansión local de células T reguladoras. El CXCR1 ("chemokine (C-X-C motif) receptor 1") induce la producción de IL-10 en los macrófagos intestinales. La tolerancia intestinal se produce escalonadamente en los ganglios linfáticos y en la mucosa. *Adaptado de Hadis (2010) [86].*

El mecanismo de tolerancia se establece debido a la presentación del antígeno por las CDs en los ganglios linfáticos mesentéricos del intestino, activando células T “naive”. Una parte de ellas activarían el factor de transcripción Fox P3 (“*forkhead box P3*”), dando lugar al subtipo celular FoxP3⁺T regulador, con actividad inhibidora. Este conjunto de células FoxP3⁺/FoxP3⁻ migran hacia el intestino, en donde se establece la tolerancia (fig. 9).

7.2 La regulación del sistema inmune por células epiteliales

Las células epiteliales intestinales, aparte de funcionar como una barrera física gracias a las uniones estrechas intercelulares, juegan un papel muy importante en la inmunomodulación del intestino, puesto que son la vía de entrada para los antígenos procedentes de bacterias y alimentos [87] y necesitan diferenciar aquellas que puedan ser patógenas, de la complejidad de estirpes residentes de la microbiota (500-1000 especies) [88]. En estos procesos, es clave la interacción entre las células epiteliales y las células inmunes, ya que las primeras no solamente transportan activamente los antígenos hacia la lámina propia, sino que además actúan como células presentadoras de antígeno, ya que expresan en su superficie las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC II) e interactúan con las células efectoras del sistema inmune [89]. Así, cuando la célula epitelial presenta el antígeno a los linfocitos T antígeno-específicos, éstos entran en un proceso de anergia, situación en la que los linfocitos, pese a estar presentes, no son activos, no responden y no se produce una respuesta inflamatoria [90, 91]. En condiciones patológicas, probablemente estos mecanismos de regulación no funcionen adecuadamente, de forma que los antígenos bacterianos obvian a la célula epitelial y contactan directamente con las células del sistema inmune, induciendo por tanto, una respuesta inflamatoria local [92].

La interacción constante entre el hospedador y la microbiota afecta a la homeostasis del organismo en condiciones normales y patológicas. Así, por ejemplo, tanto el lumen del intestino delgado como en el colon están continuamente expuestos a bacterias comensales Gram-negativas y por tanto a sus LPSs; lo que debería desencadenar la activación de los TLRs y la consecuente liberación de mediadores

pro-inflamatorios. Sin embargo, las células epiteliales intestinales tienen unos niveles de expresión bajos para este tipo de receptores evitando la estimulación frente al LPS de las bacterias comensales [93]. Las CDs son capaces de inducir un fenotipo T regulador sobre el linfocito T “naive”, capaz de suprimir la respuesta inflamatoria a través de citoquinas como la IL-10 o el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). En situaciones patológicas se activan los mecanismos inflamatorios, secretándose citoquinas sintetizadas por los linfocitos T (como el IFN- γ o el TNF- α) que inducen un aumento de la producción de los TLRs, y concomitantemente un aumento de la secreción de más mediadores inflamatorios por las células epiteliales [94]. Así, en situaciones patológicas como la inflamación intestinal se produce una sobre-expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4 [95]; pudiendo generar una reactividad anormal y exacerbada frente a bacterias de la propia microbiota [96].

8. La inmunomodulación por los β -D-glucanos

La complejidad del sistema inmune se debe a la existencia de numerosos distintos tipos celulares que circulan por el cuerpo o que residen en tejidos específicos con funciones diferentes. Cada tipo celular juega un papel único, con diferentes formas de reconocer a los antígenos, de comunicarse con otras células y de llevar a cabo sus funciones. En este contexto aparecen los inmunomoduladores, moléculas que producen un efecto sobre el sistema inmune, actuando por supresión (inmunosupresor) o por inducción (inmunoestimulador) de la respuesta inmune.

El uso de este tipo de compuestos, incluidos en forma de aditivos en alimentos, podría ser útil para combatir infecciones, prevenir cánceres del tracto digestivo o tratar patologías debidas a una alteración del propio sistema inmune, como es el caso de las enfermedades inflamatorias intestinales autoinmunes, incluida entre ellas la enfermedad de Crohn [97, 98].

La mayoría de los β -glucanos se consideran carbohidratos no digeribles, fermentados por la microbiota intestinal [20]. La información sobre su mecanismo de acción es escasa, si bien, es conocida su actividad inmunomoduladora en muchas especies, incluyendo humanos y otros mamíferos como rumiantes, cerdos, peces y aves de

corral. Sus efectos están mediados por la respuesta inmune innata y por tanto, los β -glucanos pueden ser reconocidos por receptores específicos que desencadenan la secreción de citoquinas específicas, así como la estimulación humoral que forma parte de la respuesta adaptativa [99-101].

Por esto, se conoce a los β -glucanos como “modificadores de la respuesta biológica” debido a su capacidad para activar el sistema inmune, e incluso por su capacidad anti-carcinogénica (mediada por la activación del sistema inmune) [102]. Pillemer y Ecker, 1941, describieron el efecto sobre células del sistema inmune de un extracto crudo de pared de levaduras denominado zymosan, indicando que este extracto era capaz de activar la inmunidad innata no específica [103]. En la década de los años 80 del siglo pasado, Czop y Austen (1985) describieron que la acción del zymosan implicaba su unión a un receptor específico de (1-3)- β -D-glucanos [104], que posteriormente fue identificado y denominado Dectin-1 [105].

Sus efectos los ejercen a través de la estimulación de la producción de mediadores pro-inflamatorios, citoquinas, quimioquinas, y sobre-expresión de moléculas co-estimuladoras (fig. 10). A nivel celular, la unión a receptores específicos y la internalización de estos carbohidratos consta de dos fases: (i) una fase rápida de unión al receptor del glucano, (ii) una segunda fase de internalización lenta [106]. Tras estos procesos, los glucanos pueden activar las vías de señalización del factor de transcripción NF κ B, que determina un aumento de la secreción de determinadas citoquinas [99, 101].

Además, la función inmunomoduladora de los β -glucanos está íntimamente relacionada con su estructura tridimensional, su masa molecular elevado, el enlace β (1-3) y el grado de las ramificaciones [107]. En consecuencia, diferentes (1-3)- β -D-glucanos son capaces de interactuar con diferentes receptores, debido a las diferencias estructurales. De hecho, se ha podido demostrar que los β -glucanos de cadena lineal, que contienen enlaces β (1-3) (por ejemplo el curdlano), así como los ramificados en posición O-4 y O-6 (aislados de hongos como *Candida albicans* y *Pneumocystis carinii*), pueden activar numerosos receptores como: Dectin-1 [108],

receptor del complemento 3 (CR3), receptores SR clases A y B, y receptores TLR-2/TLR-6 (heterodímero) y TLR-4 [109]. Estos receptores se encuentran principalmente en la superficie de células específicas como macrófagos, monocitos, CDs, neutrófilos, eosinófilos y las células NK, además de algunas células no inmunes como los enterocitos y los fibroblastos [110].

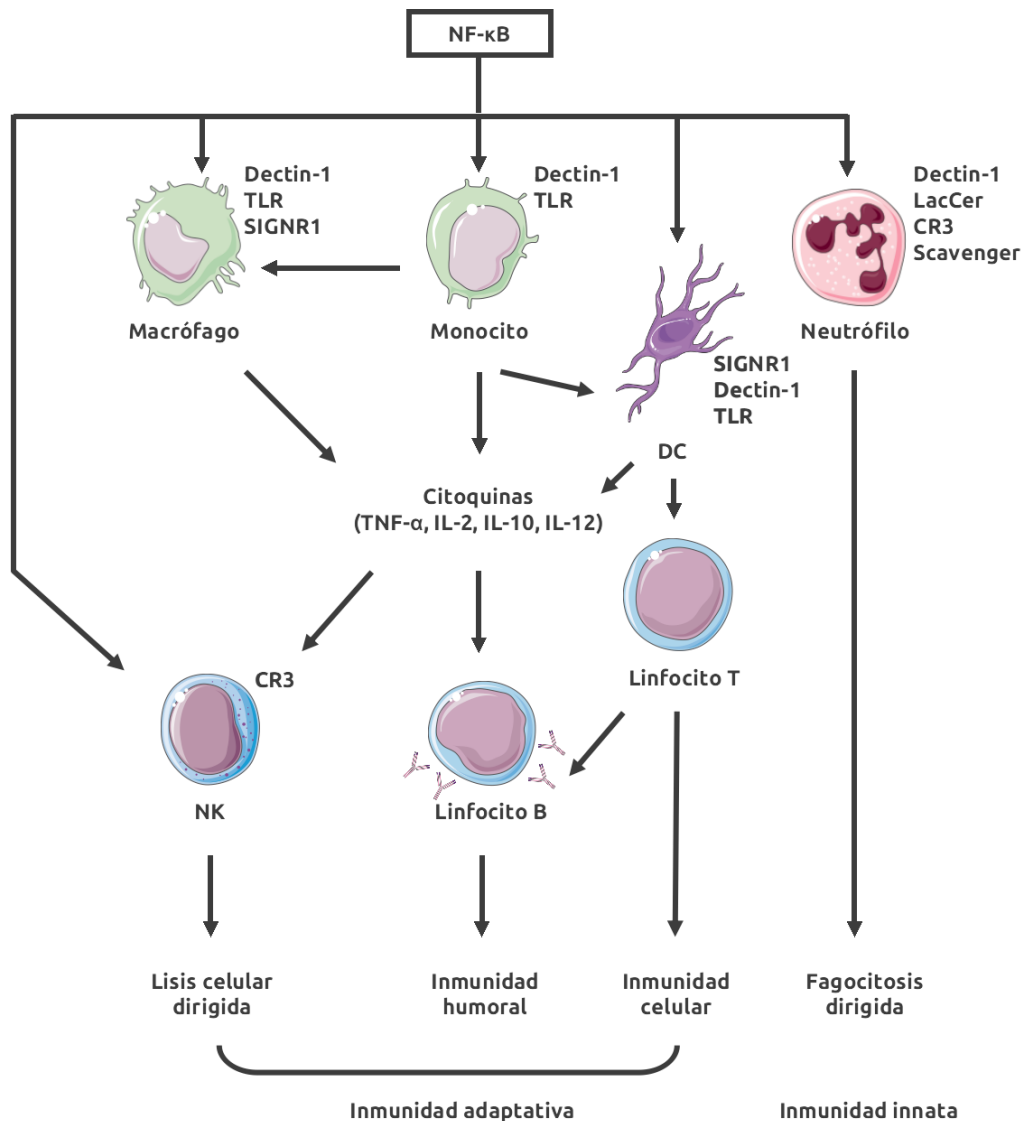


Figura 10. Inmunomodulación mediada por β-glucanos. La unión de dichos polisacáridos a sus receptores produce una cascada de señales a través del NFκB, activando diferentes tipos celulares del sistema inmune innato y adaptativo, y provocando la liberación de citoquinas y fagocitosis. A la derecha de cada tipo celular, aparecen indicados los receptores de β-glucanos que expresan. LACCER ("lactosilceramide receptor"); SIGN-R1 ("SIGN specific Intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin-related gene 1"); CR3 ("complement receptor 3"); Scavenger (SR, "Scavenger receptor"). Adaptada de Chan (2009) [20].

Los hongos, especialmente los Basidiomicetos, son una fuente de β -glucanos con alta actividad biológica. La mayoría poseen enlaces $\beta(1-3)$ en la cadena principal y en ocasiones, puntos de ramificación $\beta(1-6)$. La presencia de estos puntos de ramificación, incrementa su actividad antitumoral y sus efectos inmunomoduladores [111]. Se cree además que la posibilidad de que estos polímeros formen estructuras supramoleculares ofrece una mayor capacidad inmunogénica (aparte del propio potencial de la estructura primaria). Por ejemplo, la conformación terciaria de triple hélice descrita para el esquizofilano, un $(1-3)$ - β -D-glucano con ramificaciones en *O*-6 obtenido del *Aphylllophoral fungus*, parece ser responsable de su actividad antitumoral [112].

Algunos de los efectos beneficiosos demostrados para los β -glucanos derivados de hongos o levaduras, recientemente, también se han postulado para los EPSs de origen bacteriana (HoPs y HePs) y, números estudios realizados con las cepas productoras, indican que los efectos, igualmente, dependen la masa molecular del polisacárido estudiado [113]. La mayoría de las BAL utilizadas como probióticos (de acuerdo a la FAO/WHO (Organización Mundial para la Salud) para la elaboración de alimentos funcionales tienen propiedades inmunomoduladoras [114] y producen EPSs (aunque su capacidad para inmunomodular es estirpe-dependiente y hasta el momento no se ha relacionado directamente con los EPSs). Si a esto unimos el hecho de que la formación de estructuras supramoleculares, es beneficiosa para incrementar las capacidades inmunomoduladoras de los EPSs, los $(1-3)$ - β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2 y sintetizados por BAL, podrían ser *a priori* buenos inmunomoduladores.

8.1 Los receptores de los β -D-glucanos

Los β -glucanos son estructuras moleculares conservadas que actúan como PAMPs, y sus receptores, los PRRs, inducen una respuesta celular mediada por macrófagos, neutrófilos y CDs, entre otras células inmunes, y que a su vez determinan una respuesta humoral a través de los granulocitos que se encuentran en la medula ósea o en los GALT, o a través de la activación de las células T [20, 115].

Dentro de los PRRs, los principales responsables del reconocimiento de los β -glucanos son [105, 116] (fig. 11):

- **El CR3**, una integrina heterodimérica formada por el CD11b (clúster de diferenciación 11b) y el CD18 [110, 117]. Se expresa en un amplio abanico de células inmunes como los neutrófilos, células NKs, CDs, linfocitos B y T. Cuando los β -glucanos se unen al CR3 se activa la vía de señalización iC3 (componente 3 del complemento inactivado) causando citotoxicidad tumoral. La unión a macrófagos es independiente del CR3, mientras que en el caso de los neutrófilos es dependiente de este receptor [20].
- **Familia de receptores SR**, unas glicoproteínas que se encuentran en la superficie de células mieloides y endoteliales. Su unión con los β -glucanos (lineales y ramificados) parece contribuir a la eliminación de endotoxinas [118, 119].

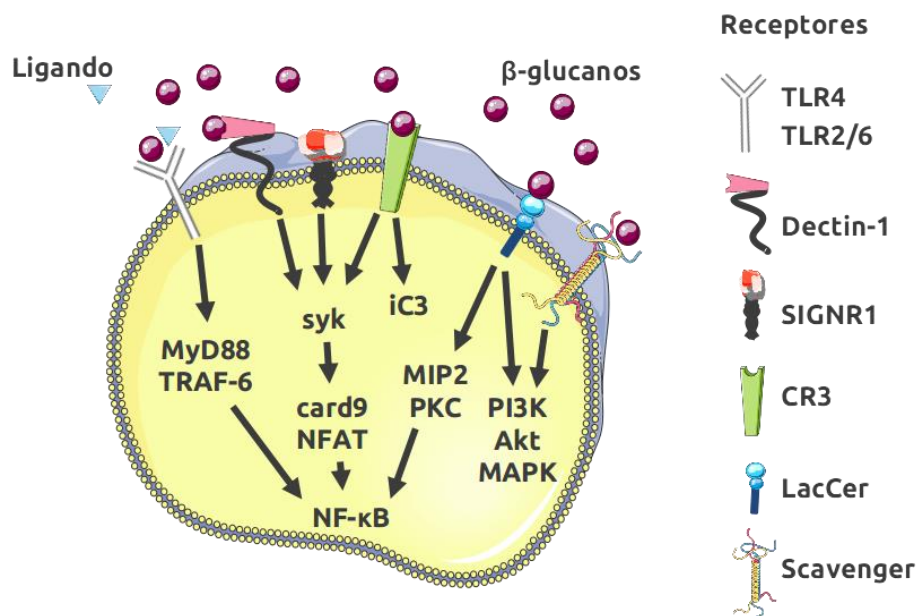


Figura 11. Receptores de β -glucanos. La interacción de dichos polímeros con los diferentes receptores de membrana localizados en las células inmunes, puede producirse independientemente o en combinación con otros ligandos; activando moléculas implicadas en diferentes vías de señalización. *Adaptado de Chan (2009) [20].*

- **El Dectin-1**, el primer receptor de β -glucanos descubierto. Pertenece a la familia de las lectinas tipo-C y se puede presentar como monómero u homodímero (normalmente es más efectivo en esta última estructura) [120]. Se localiza

principalmente en las membranas de células mieloides, incluyendo macrófagos, CDs y células epiteliales intestinales [121]. La cascada de señales que activa, contribuye en una variedad de respuestas incluyendo la fagocitosis, la oxidación, la degranulación de los neutrófilos y la producción de citoquinas y quimioquinas que reclutan y coordinan la activación de otras células inmunes.

- **Los TLRs**, que juegan un papel importante en el reconocimiento de los PAMPs en la inmunidad innata. Forman una superfamilia con los receptores de la IL-1. Son glicoproteínas de tipo transmembrana y todos los miembros comparten un dominio citoplasmático, TIR (*"Toll/IL-1 Receptor"*), que inicia la vía de señalización. Los receptores que se han encontrado asociados con los β -glucanos son: el TLR-2, el TLR-4 [108, 122] y el TLR-6 [20]; expresados predominantemente en las células centinela del sistema inmune, como macrófagos y CDs, y también en el epitelio intestinal el caso del TLR-4.

El papel de los TLRs en el reconocimiento de los β -glucanos, se plantea en ocasiones ciertamente confuso, debido a que los principales estudios que muestran estas interacciones están realizados con glucanos no purificados; por lo que el efecto del producto puro podría divergir [20]. Diversos trabajos han mostrado que el receptor Dectin-1 puede colaborar en la respuesta inmune con otros TLRs como TLR-5, TLR-7 y TLR-9 (además de los TLRs anteriormente citados); reconociendo simultáneamente los mismo glucanos, como en el caso de Dectin-1 y el heterodímero.

8.2 La transducción de señales específicas activadas por el reconocimiento de los β -D-glucanos

La inmunomodulación se produce debido a la transducción de señales en la célula, en la que un ligando activa a su receptor transmembrana, activando a su vez moléculas intracelulares y generando una respuesta específica. También puede ocurrir que en este proceso de transducción de señales, implique a segundos mensajeros que participen en la señalización celular. Este proceso desencadena una serie de fosforilaciones/defosforilaciones en residuos tirosina/serina de determinadas proteínas efectoras que participan en la cascada interna de activación, conduciendo finalmente a la regulación de la expresión génica a nivel

transcripcional. La respuesta es muy rápida y amplificada, provocando grandes cambios en la célula debido a la modulación (activación/represión) de la transcripción génica.

La gran variedad de señales fisicoquímicas a las que las células pueden responder, hace pensar en una amplia diversidad de mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, la evolución ha seleccionado y perfeccionado sólo una serie limitada de cadenas de eventos que son capaces de generar la respuesta apropiada a cada estímulo en diferentes tipos celulares. Esta convergencia, se refleja en los receptores celulares que están constituidos por dos regiones o dominios: uno de reconocimiento del ligando, externo, y otro efector de transducción de señales, interno o citoplasmático.

Dentro del reconocimiento y transducción de señal de β -glucanos, podemos encontrar 2 tipos principales de receptores celulares:

- **Los receptores acoplados a las proteínas G**, en los que la unión de los ligandos extracelulares provoca la activación de las proteínas G (proteínas de unión al guanosina 5'-trifosfato (GTP), a través del intercambio de una molécula de GTP por una molécula de GDP (guanosina 5'-difosfato). La transducción de señales, con segundos mensajeros, puede ocurrir por la vía del AMPc (adenosina monofosfato-3', 5' cíclico) o la del PIP3 (fosfoinositol-3-fosfato).
- **Los receptores tirosina-quinasas (RTKs)**, que pertenecen al grupo de receptores ligados a enzima. La unión del ligando produce la fosforilación de residuos de tirosina, activando los RTKs que catalizan nuevas reacciones intracelulares. Dentro de este grupo están los receptores de la mayor parte de los factores de crecimiento.

Entre las principales vías de señalización que activan los β -glucanos, se encuentran:

- **La vía de la MAPK (*"mitogen-activated protein kinase"*)**, su activación a través de la proteína Ras, y posterior síntesis y activación de factores de transcripción como Fos y Jun; estimula la producción de nuevos factores de crecimiento, de

receptores para dichos factores y de proteínas que controlan la entrada de la célula en el ciclo celular (fig. 12).

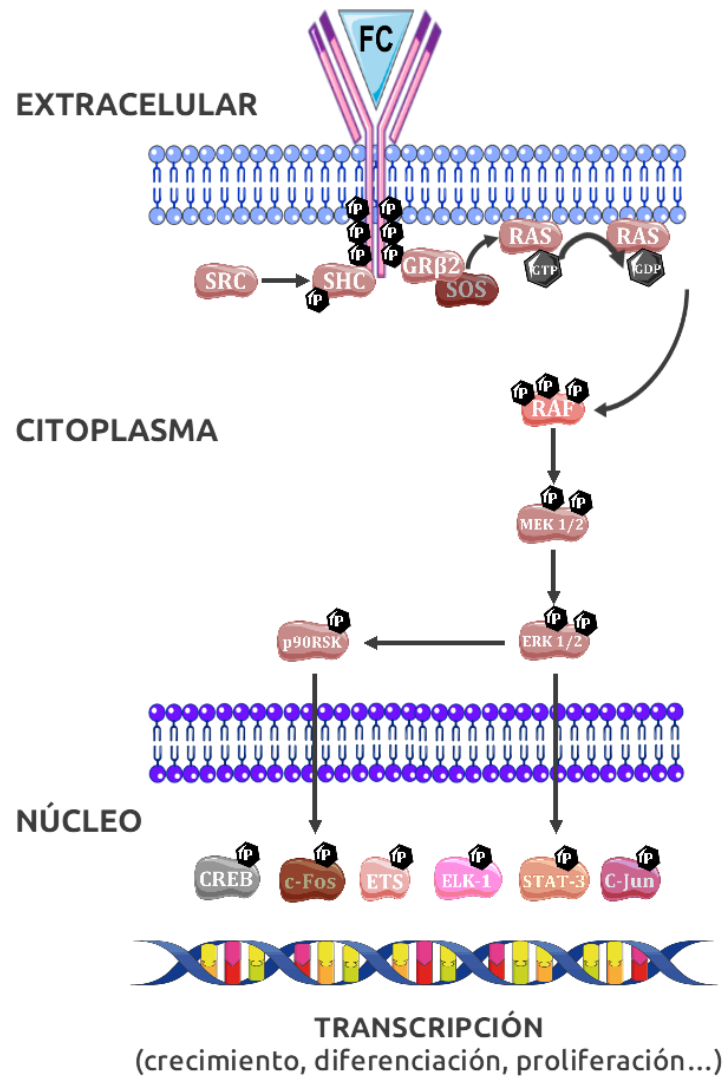


Figura 12. Vía de señalización de la MAPK. La unión del ligando desencadena una cascada de señalización por proteínas, que se comunican añadiendo grupos fosfato, activando, consecuentemente, a las proteínas vecinas. Al final de la ruta se activan factores de transcripción en el núcleo celular, para expresar proteínas envueltas en cambios celulares. *Adaptada de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) [124].*

- **La vía de la PI3K (fosfoinositol 3-quinasa),** activa a la quinasa Akt, que a su vez activa otros factores como mTor, implicados en la proliferación y supervivencia celular, por inhibición de la apoptosis (fig. 13).

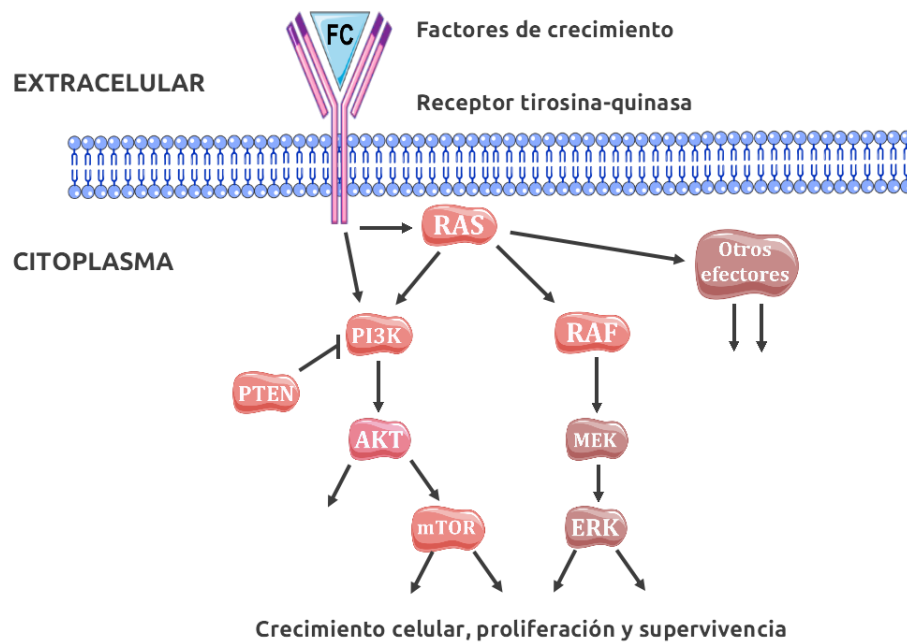


Figura 13. Vía de la PI3K. La activación de esta ruta, a través de los receptores RTKs o asociados a proteínas G, induce una cascada de fosforilaciones que regulan mecanismos celulares importantes como la transcripción, la traducción, la proliferación, el crecimiento y la supervivencia celular. *Adaptada de KEGG [124].*

La unión de los β -glucanos a sus receptores, desencadena una cascada de señales, que en última instancia será la responsable de regular los mecanismos de la inmunidad celular. Así, la unión al Dectin-1 puede activar, en macrófagos y CDs, la vía de las MAPK con importantes efectos en los procesos de proliferación y diferenciación. La activación de esta ruta conduce finalmente a la activación de diferentes factores de transcripción como el NFAT (*"nuclear factor of activated T-cells"*); regulando la expresión de citoquinas como la IL-2, la IL-10 y la IL-12p70 [125], y activando la fagocitosis y la generación de especies reactivas del oxígeno. Por otro lado, la interacción con este receptor y con el heterodímero TLR-2/TLR-6 desencadena la producción de diversas citoquinas como el TNF- α y la IL-12 (mientras que el Dectin-1 por sí solo no es capaz de hacerlo) [126]; demostrando la actividad pro-inflamatoria de los β -glucanos, que a su vez será la responsable de regular los mecanismos de crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia celular.

OBJETIVOS

Los (1-3)- β -D-glucanos lineales ramificados, en posición O-4 u O-6, aislados de cereales, hongos y algas, tienen un efecto inmunomodulador sobre las células del sistema inmune.

Las bacterias, aisladas de bebidas alcohólicas, producen y secretan un (1-3)- β -D-glucano con una sustitución en posición O-2; exopolisacárido cuya estructura es diferente a las que poseen los (1-3)- β -glucanos cuya funcionalidad ha sido previamente estudiada.

Se ha demostrado que *Pediococcus parvulus* productores de EPSs, como la cepa 2.6, son capaces de inmunomodular macrófagos aislados de monocitos humanos, y que la presencia de dicho polisacárido mejora la capacidad de adhesión de bacterias ácido lácticas a la línea celular epitelial humana Caco-2. Además, la bacteria recombinante *Lactococcus lactis* NZ9000[pNGTF], que expresa la glicosiltransferasa GTF de *P. parvulus* 2.6, responsable de la síntesis del polímero, es capaz de producir un polisacárido (EPS L), con la misma estructura que el sintetizado por la estirpe parental (EPS P).

En base a lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo de Tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Establecer un método para la producción, recuperación y purificación de los dos (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición O-2, EPS L y EPS P, que permitiera obtener unos polímeros puros y libres de contaminantes, aptos para realizar estudios de inmunomodulación.
2. Analizar la capacidad inmunomoduladora de cada uno de los dos EPSs, en un modelo *in vitro* de macrófagos humanos.
3. Analizar la capacidad inmunomoduladora de cada uno de los dos EPSs, en un modelo *in vitro* de mucosa intestinal humana inflamada.

4. Analizar la capacidad inmunomoduladora de cada uno de los dos EPSs, en un modelo *ex vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal humana.
5. Dilucidar los mecanismos subyacentes a la inmunomodulación ejercida por los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2 sobre los modelos de la mucosa intestinal humana.
6. Evaluar la capacidad antiviral e inmunomoduladora de cada uno de los dos (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2 en sistemas modelos de salmónidos, estudiando su efecto sobre la infección viral *in vitro* de fibroblastos y determinando la respuesta de macrófagos a su exposición a ellos.

CAPÍTULO 1

Producción, aislamiento y purificación de (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2

1. INTRODUCCIÓN

Los EPSs producidos por BALs parecen poseer potenciales propiedades funcionales; ya que experimentos *in vitro* indican que pueden producir efectos beneficiosos para la salud humana, como actividad antitumoral, inmunoestimulante, y capacidad para reducir los niveles de colesterol sérico [127, 128]. Además, estos polímeros son sumamente interesantes para las industrias agroalimentarias por su diversidad estructural, que abre el camino a su utilización para desarrollar nuevos productos. Por otra parte, varias especies de BAL tienen el status "GRAS" otorgado por la FDA, o el status de "QPS" concedido por la EFSA [129]. Este hecho facilita la posible aplicación de sus EPSs bien como aditivos o como espesantes sintetizados *in situ*. Por otro lado, la baja producción de polisacáridos sintetizados por la mayoría de las bacterias estudiadas (con la excepción de los α -glucanos), ha obstaculizado tanto su caracterización molecular como su explotación comercial. En consecuencia, es necesario el desarrollo de metodologías optimizadas de producción y purificación de estos EPSs con el fin de facilitar su caracterización, así como explorar tanto su diversidad estructural como sus potenciales aplicaciones.

Existen cepas de BALs pertenecientes a los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Oenococcus* aisladas de sidra y vino que producen y secretan un (1-3)- β -D-glucano ramificado en la posición O-2 [14, 130-132]. Este polímero es sintetizado por una única enzima denominada glicosiltransferasa GTF; que es una proteína de membrana capaz de polimerizar residuos glucosídicos utilizando la UDP-glucosa (uridina 5'-difosfato glucosa) como sustrato [35, 36, 133, 134]. Estudios realizados con *Pediococcus* y *Lactobacillus* productores de este tipo de β -glucano indican, que estos EPSs son capaces de inmunomodular macrófagos [67, 68].

Para poder realizar estudios de inmunomodulación es imprescindible una elevada pureza del material, ya que en este tipo de ensayos incluso una baja concentración de moléculas contaminantes inmunogénicas podría dar lugar a una respuesta elevada que no correspondería a la producida por el compuesto de interés.

Así, con el objetivo ulterior de estudiar la posible actividad inmunomoduladora de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2 de distintos orígenes bacterianos, en este capítulo se ha estandarizado la producción y purificación de dos EPSs denominados EPS P y EPS L. Estos polisacáridos fueron producidos respectivamente por *P. parvulus* 2.6 (bacteria aislada de sidra) y por la estirpe recombinante *L. lactis* NZ9000[pNGTF] (que expresa la glicosiltransferasa GTF de la cepa 2.6) y se aislaron a partir de los sobrenadantes de cultivos bacterianos. El objetivo final fue obtener preparaciones de (1-3)- β -D-glucanos homogéneas y libres de impurezas (componentes del medio de cultivo o de las bacterias como DNA, RNA y/o proteínas).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

La cepa *P. parvulus* 2.6 [14] fue aislada de sidra en el Departamento de Química Aplicada de la Facultad de Química (Universidad del País Vasco UPV / EHU, San Sebastián, España). *P. parvulus* 2.6 contiene en el plásmido pPP2 el gen *gtf*, que codifica la glicosiltransferasa GTF [35, 65]. La cepa recombinante *L. lactis* NZ9000[pNGTF] porta el plásmido pNGTF, que contiene el gen *gtf* de *P. parvulus* 2.6 bajo el control del promotor del gen *nisA* de *L. lactis*, inducible por la adición de nisina al medio de cultivo [36].

P. parvulus 2.6 y *L. lactis* NZ9000[pNGTF] se crecieron rutinariamente y respectivamente en el medio de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Pronadisa) o en el medio ESTY (Pronadisa), suplementado con 20% (v/v) de glicerol para su almacenamiento a largo plazo a -80 °C.

2.2 Producción del EPS P por *P. parvulus* 2.6

P. parvulus 2.6 se creció a 30 °C hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm (Abs₆₀₀) de 2, en el medio MRS suplementado con 2 % de glucosa (Merck), 0,05 % (w/v) de hidrocloreuro de L-cisteína (Merck), y 0,1 % (w/v) de Tween 80 (Pronadisa).

Para la producción del EPS P, el inóculo bacteriano fue diluido 1:100 en el medio semi-definido MST [135], carente de extracto de carne o peptona y de extracto de

levadura; todos ellos ingredientes que podrían interferir con la cuantificación del EPS P y con su utilización en experimentos posteriores. *P. parvulus* 2.6 se creció en medio MST suplementado con glucosa (50 g L^{-1}) y etanol al 4,9 % (v/v), en un fermentador de 3 L (Bioflo 110, New Brunswick Scientific), a 30°C durante 96 h. El pH del cultivo se ajustó a 5,2 con NaOH 5 M, y se incubó con ligera agitación (50-70 rpm) para mantener el medio de crecimiento homogéneo, en condiciones anaeróbicas obtenidas por burbujeo con nitrógeno ($0,2 \text{ L h}^{-1}$) de forma continua.

2.3 Producción del EPS L por *L. lactis* NZ9000[pNGTF]

Se inoculó, con *L. lactis* NZ9000[pNGTF], 1 L de medio CDM [136] suplementado con glucosa al 0,5 % y cloranfenicol a 5 mg mL^{-1} . El cultivo se creció a 30°C hasta alcanzar una $\text{Abs}_{600} = 0,6$ y a continuación, se centrifugó a $6.816 \times g$ durante 20 min a 4°C y las células presentes en el sedimento, se resuspendieron en medio fresco CMD sin antibiótico.

Para la producción del EPS L, la expresión del gen *gft*, que codifica la glicosiltransferasa GTF se indujo por adición de nisina a $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ e incubación adicional durante 24 horas a 30°C .

2.4 Aislamiento del EPS P a partir del sobrenadante del cultivo de *P. parvulus* 2.6

Las bacterias procedentes del cultivo de *P. parvulus* 2.6 se centrifugaron a $16.000 \times g$, a 4°C durante 30 min.

Para precipitar el EPS P presente en el sobrenadante se adicionaron tres volúmenes de etanol absoluto frío y la mezcla se incubó durante 16 h a 4°C . El precipitado se recuperó mediante centrifugación a $14.000 \times g$ durante 10 min a 4°C y se disolvió en agua desionizada. El ciclo de precipitación y centrifugación se realizó tres veces. Tras la disolución del precipitado final en agua, el EPS se dializó durante 2 días frente a agua desionizada (realizando 2 cambios cada día), utilizando una bolsa de diálisis (Medicell International) con un punto de corte de 12-14 kDa.

Después de la diálisis, la solución se congeló a -80 °C y se liofilizó (equipo Telstar Cryodos) a -50 °C durante 3 días para eliminar por completo el disolvente. El sólido resultante de la liofilización se almacenó en un desecador a temperatura ambiente.

2.5 Aislamiento del EPS L a partir del sobrenadante de *L. lactis* NZ9000[pNGTF]

Para mejorar la liberación del EPS de la superficie bacteriana, los cultivos se calentaron a 60 °C durante 20 min en un baño de agua. A continuación las bacterias, se eliminaron por centrifugación ($10.651 \times g$ durante 60 min a 4 °C).

El EPS L presente en el sobrenadante fue precipitado por la adición de tres volúmenes de etanol absoluto frío e incubación de la mezcla durante 16 h a -20 °C. El EPS se recuperó por centrifugación a $10.651 \times g$ durante 60 min a 4 °C y se resuspendió en agua desionizada. El ciclo de precipitación y centrifugación se repitió tres veces. Seguidamente el EPS L, resuspendido en agua desionizada, se dializó durante 2 días frente a agua desionizada y utilizando una bolsa de diálisis con un punto de corte de 12-14 kDa.

Finalmente, el EPS L se congeló a -80 °C y se liofilizó a -50 °C durante 3 días para eliminar por completo el disolvente, almacenándose el liófilo en un desecador a temperatura ambiente.

2.6 Purificación del EPS P y del EPS L

Para eliminar las impurezas de la preparación, los EPSs se purificaron por cromatografía de exclusión molecular.

Los EPSs se disolvieron en NaOH 0,3 M (para hidrolizar contaminantes como proteínas residuales y para mejorar la disolución del EPS) y a continuación se centrifugaron para eliminar el material insoluble. El sobrenadante obtenido se cargó en una columna de Sepharose CL-6B (GE) (60 cm x 2,6 cm) equilibrada con NaOH 0,3 M. Dicha solución también se utilizó para eluir los polisacáridos a un flujo de 0,3 mL min⁻¹. Se recogieron las fracciones de interés, y alícuotas de las mismas se utilizaron para evaluar su contenido en hidratos de carbono por el método del fenol-sulfúrico [137].

Para estimar la masa molecular aparente (M_r) de los EPSs, se utilizó una curva de calibración utilizando dextranos comerciales (Pharmacia): el azul de dextrano (2×10^6 Da) y los dextranos: T500 (500 kDa), T70 (70 kDa) y T10 (10 kDa), así como la vitamina B₁₂ (1.356 Da). Las fracciones correspondientes al mismo pico cromatográfico se juntaron y el material purificado se dializó frente a agua desionizada hasta la neutralidad, utilizando una bolsa de diálisis con un punto de corte de 12-14 kDa.

Posteriormente se congeló, liofilizó y almacenó como se indica en el apartado 2.5 de este capítulo.

2.7 Determinación de la concentración de los EPSs y de la presencia de contaminantes

La concentración de los EPSs se estimó valorando el contenido de hidratos de carbono neutros mediante el método del fenol-sulfúrico [137]. Esta determinación se llevó a cabo utilizando directamente las muestras obtenidas tras los diferentes pasos de aislamiento y purificación descritos en los apartados previos (2.4, 2.5 y 2.6) o a partir de los EPSs purificados liofilizados tras ser pesados y disueltos en agua a una concentración teórica de 1 mg mL^{-1} .

Las muestras conteniendo los EPSs (0,5 mL) se precipitaron con un volumen de etanol al 80 % en un microtubo. Se centrifugaron a $15.000 \times g$ durante 10 min a 4°C ; eliminando el sobrenadante, resuspendiendo el precipitado en agua desionizada y repitiendo de nuevo la precipitación y centrifugación. Una vez eliminado el último sobrenadante, se secaron las muestras en un desecador (BHO) durante 30 min y posteriormente los EPSs se resuspendieron en agua desionizada y se congelaron a -20°C para la posterior determinación de su concentración.

Brevemente, para la realización del método del fenol-sulfúrico, se mezclaron 0,5 mL de cada una de las muestra de EPS con 0,5 mL de fenol al 0,5 % y 2,5 mL de H_2SO_4 puro. La mezcla se agitó suavemente y se incubó en baño a 100°C durante 5 min. A

continuación se enfriaron las muestras en hielo para parar la reacción observándose el cambio de color a naranja-marrón, tras lo cual se midió la $Abs_{490\text{ nm}}$ en un espectrofotómetro. Para extrapolar los valores de concentración a partir de los valores de Abs, se empleó una curva patrón generada con soluciones de glucosa en un rango de concentración de 2-160 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La contaminación de las preparaciones con DNA, RNA y proteínas se determinó en las soluciones de las muestras purificadas o directamente en el sobrenadante del cultivo, utilizando los ensayos de cuantificación fluorescente correspondientes en un fluorímetro 2.0 Qubit (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Los límites de detección de esta técnica son de 0,5 mg mL^{-1} de DNA, 20 ng mL^{-1} de RNA y 1 mg mL^{-1} de proteínas.

2.8 Detección de los EPSs por microscopía electrónica

La presencia de los EPSs unidos a las bacterias en cultivos de *P. parvulus* 2.6 y *L. lactis* NZ9000[pNGTF] se determinó por microscopía electrónica de transmisión usando la tinción negativa con acetato de uranilo [138]. Se utilizó también esta técnica para visualizar los EPSs purificados.

Para ello, *P. parvulus* 2.6 se creció hasta la fase estacionaria de crecimiento en medio MRS a 30 °C y el cultivo de *L. lactis* NZ9000[pNGTF] se indujo con nisina durante 24 h, como se indica en el apartado 2.3. Antes de la tinción negativa, los EPSs purificados se resuspendieron a una concentración de 1 mg mL^{-1} en tampón PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1mM, NaCl 140 mM, y KCl 3mM) a pH 7.

Las muestras se prepararon en rejillas comerciales de microscopía electrónica de cobre de 300 agujeros recubiertas de Formvar y carbón (Electron Microscopy Sciences). Inmediatamente antes de su utilización, las rejillas se sometieron a una descarga iónica durante 1 min para favorecer la adsorción de la muestra. A continuación la rejilla se colocó sobre 10 μL de la muestra (en el caso de los cultivos bacterianos, concentrado cinco veces en NH_4Ac 0,1 M y del EPS en tampón PBS) durante 1 min, tras lo cual se retiró el exceso de solución con papel de filtro (Albet). Posteriormente, para contrastar la muestra por tinción negativa, la rejilla se colocó

sobre una gota de acetato de uranilo al 2 % durante 40 s y luego se retiró rápidamente el exceso de reactivo secándose al aire.

Las muestras se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1230) operado a 100 kV. Las imágenes se digitalizaron mediante escáner (Epson Perfection 4870 Foto) a 1.200 dpi de resolución final.

2.9 Análisis de los EPSs por espectroscopia de infrarrojos

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron por la técnica de KBr.

Aproximadamente 2 mg de muestra seca se mezclaron a fondo en un mortero con 300 mg de KBr y se mantuvieron en un desecador. La pastilla se preparó usando una prensa hidráulica, aplicando una presión de 2 toneladas durante 2 min y luego 10 toneladas durante 6 min. Los espectros se registraron en un FTIR 4200 (Jasco Corporation) en un rango de 400-4000 cm^{-1} .

El detector utilizado fue sulfato de triglicina con una resolución de 4 cm^{-1} .

2.10 Análisis de la composición de monosacáridos de los EPSs

Para el análisis de azúcares neutros, los polisacáridos (aproximadamente 1 mg) se hidrolizaron primero con ácido trifluoroacético 3 M a 121 °C, durante 1 h). Una vez finalizada la hidrólisis, se añadió a cada muestra 100 μL de inositol como estándar interno y se evaporó a sequedad en un rotavapor para eliminar el ácido. Los monosacáridos liberados en la hidrólisis fueron convertidos en sus correspondientes acetatos de alditol por reducción con NaBH_4 y posterior acetilación [139].

La identificación y cuantificación de los productos se realizó por cromatografía de gases-líquidos utilizando un equipo modelo 6890A (Agilent) equipado con un detector de ionización de llama y empleando una columna de sílice fundida HP5 (30 m x 0,25 mm ID x 0,2 μm de espesor de película) con He como gas portador. Inyector y detector se fijaron en 275 °C. Las muestras de 1 μL se inyectaron con una relación de división de flujo de 1:50, aplicando a la columna un programa de temperatura: 175 °C durante 1 min, a continuación una rampa de 2,5 °C min^{-1} hasta 215 °C seguida

de otra de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $225\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniendo la temperatura final durante 1,5 min.

La identificación se realizó sobre la base de la coincidencia del tiempo de retención de componentes de la muestra con los medidos previamente para los estándares analizados en condiciones idénticas, empleando inositol como patrón interno. El contenido en fosfato se estableció a partir de la determinación de fosfato inorgánico en un equipo de acoplamiento inductivo de plasma 5.500 (Perkin Elmer).

2.11 Análisis de metilación de los EPSs

Los polisacáridos (1-5 mg) se metilaron siguiendo el método de Ciucanu y Kerek (1984) [140] y se hidrolizaron con ácido trifluoroacético 3 M a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Los monosacáridos resultantes parcialmente metilados se convirtieron en sus acetatos de alditol correspondientes por reducción con NaBD_4 y posterior acetilación con 250 μL de piridina: anhídrido acético (1: 1) durante 1 hora a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ [139].

Los acetatos de alditol parcialmente metilados obtenidos se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas en un aparato modelo 6890A/5975C (Agilent), con He como gas portador. El inyector se programó a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras de 1 μL se inyectaron con una relación de división de flujo de 1:50 y sus componentes separados en una columna de sílice fundida HP5MS (Agilent) (30 m x 0,25 mm ID x 0,2 μm espesor de película), con un programa de temperatura que comenzó a $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min) y luego aumentó a razón de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los espectros de masas fueron adquiridos en el rango de m/z entre 40 y 450.

La identificación se realizó en función del tiempo de retención y los espectros de masas de los compuestos. La cuantificación se realizó de acuerdo con el área de los picos.

3. RESULTADOS

3.1 Producción de los EPSs por *P. parvulus* 2.6 y *L. lactis* NZ9000[pNGTF]

La cuantificación de azúcares neutros por el método del fenol-sulfúrico demostró que las dos bacterias analizadas secretaban cantidades variables del EPS al medio de cultivo: *P. parvulus* 2.6, $378 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$ y *L. lactis* NZ9000 [pNGTF], $561 \pm 18 \text{ mg L}^{-1}$. La proporción de los EPSs en los sobrenadantes relativa a los contaminantes de proteína, RNA y DNA osciló entre el 65,5 % y el 95,5 % (tabla 1).

Tabla 1. Detección de biomoléculas durante las diferentes fases de purificación.

CEPA	SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS ^a				DESPUÉS DE LA PRECIPITACIÓN Y DIÁLISIS ^b				DESPUÉS DEL FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO ^b			
	EPS	PROTEÍNA	DNA	RNA	EPS	PROTEÍNA	DNA	RNA	EPS	PROTEÍNA	DNA	RNA
<i>P. parvulus</i> 2.6	65,5	34,7	0	0	98,5	<0,1	0	0	100	0	0	0
<i>L. lactis</i> NZ9000 [pNGTF]	95,5	4,5	<0,1	<0,1	98,5	1,4	<0,1	0	100	0	0	0

^aLas concentraciones de proteína, DNA y RNA se midieron directamente en los sobrenadantes. La concentración de EPS se determinó a través de la cuantificación de los azúcares neutros, después de la precipitación con etanol a partir de los sobrenadantes de los cultivos. Los resultados aparecen representados como porcentajes de la concentración total. El 100 % corresponde a la concentración total de biomoléculas detectadas (EPS, proteína, RNA y DNA) en cada muestra.

^bLas soluciones se prepararon en agua a una concentración de 1 mg mL^{-1} .

La producción de los polímeros extracelulares se detectó por análisis de los cultivos bacterianos utilizando microscopia electrónica de transmisión (fig. 1). La observación de las preparaciones de *P. parvulus* 2.6 (fig. 1A) y *L. lactis* NZ9000[pNGTF] (fig. 1B) reveló que sus EPSs formaban masas amorfas, asociadas a las células bacterianas o aparecían libres en la preparación. Del mismo modo, los polímeros se visualizaron en soluciones acuosas de los EPSs purificados. En la fig. 1C se muestra como ejemplo el EPS L producido por *L. lactis* NZ9000[pNGTF].

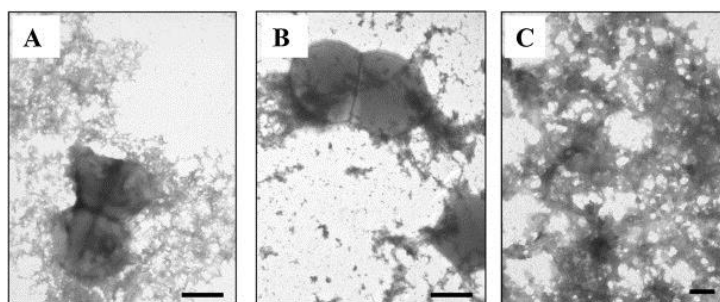


Figura 2. Microscopia electrónica de los EPSs. Tinción negativa con acetato de uranilo de las células de *P. Parvulus* 2.6 (A), *L. Lactis* NZ9000[pNGTF] (B) y del EPS L purificado (C). Las barras de escala corresponden a 500 nm en (A) y (B) y a 100 nm en (C).

3.2 Recuperación y purificación inicial de los EPSs

Generalmente los EPSs bacterianos son recuperados del medio de cultivo por precipitación provocada por la adición de un disolvente orgánico miscible con agua [141]. En este trabajo se utilizó la precipitación con etanol para la recuperación y purificación inicial de los EPSs a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos. La concentración de hidratos de carbono neutros, proteínas, DNA y RNA se analizó en soluciones acuosas de las preparaciones de EPSs para comprobar su pureza después de la precipitación con etanol, diálisis y liofilización (tabla 1).

Para lograr la precipitación de los dos EPSs a partir de los sobrenadantes de los cultivos de *P. parvulus* 2.6 y *L. lactis* NZ9000[pNGTF] fue necesario utilizar tres volúmenes de etanol.

El EPS L y el EPS P, presentes tanto en los sobrenadantes como después de la purificación inicial o del fraccionamiento cromatográfico (ver más abajo), generaron suspensiones gelatinosas a concentraciones superiores a 3 mg mL^{-1} y tuvieron que ser disueltos a una concentración de 1 mg mL^{-1} para obtener una suspensión homogénea. El contenido proteico de las preparaciones del EPS L fue muy bajo tanto en el sobrenadante del cultivo de la bacteria productora (tabla 1), como después de la primera etapa de purificación (tabla 1). Por el contrario, las preparaciones del EPS P producido por *P. parvulus* 2.6 contenían cantidades variables de proteínas y ácidos nucleicos, especialmente en el sobrenadante inicial (tabla 1). Los resultados obtenidos mostraron que la purificación dio como resultado, en todos los casos, una

disminución de la contaminación de proteínas, DNA y RNA hasta su completa desaparición tras la purificación cromatográfica, de modo que se obtuvieron preparaciones finales conteniendo una concentración de carbohidrato de aproximadamente el 100 %.

Probablemente la mayor pureza de las preparaciones iniciales del EPS L se debió a la distinta composición de los medios de cultivo empleados para cultivar las bacterias productoras de EPS.

3.3 Purificación, estimación de la masa molecular y determinación de la composición de monosacáridos de los EPSs

La cromatografía de exclusión molecular es un procedimiento muy utilizado para purificar en un solo paso algunos HePs de las paredes celulares de los hongos [142]. Por otra parte, este método ha sido también utilizado con éxito para purificar HePs neutros extracelulares de bifidobacterias [143].

Por ello, para purificar adicionalmente los polisacáridos y estimar su masa molecular promedio, las muestras liofilizadas se fraccionaron cromatográficamente, usando dicha técnica, a escala preparativa después de su disolución en el disolvente apropiado, de acuerdo con su solubilidad. Así, utilizando NaOH 0,3 M se consiguió disolver la cantidad suficiente del EPS P y del EPS L para poder realizar este análisis. El material purificado, una vez caracterizado química y estructuralmente, se empleó para evaluar su actividad biológica en los capítulos 2-5 de este trabajo.

Después del fraccionamiento cromatográfico se detectó, en ambas preparaciones, un único pico de masa molecular aparente (M_r) $> 10^6$ Da (fig. 2).

En cuanto a su composición química, determinada tras hidrólisis, derivatización y posterior análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas, se comprobó que ambos estaban compuestos exclusivamente por glucosa (resultados no mostrados). También, el análisis de los EPSs purificados no reveló contaminación detectable por proteínas, RNA y DNA (tabla 1).

Así, los resultados obtenidos validaron el uso de la cromatografía de exclusión molecular para purificar los EPSs producidos por las dos cepas estudiadas.

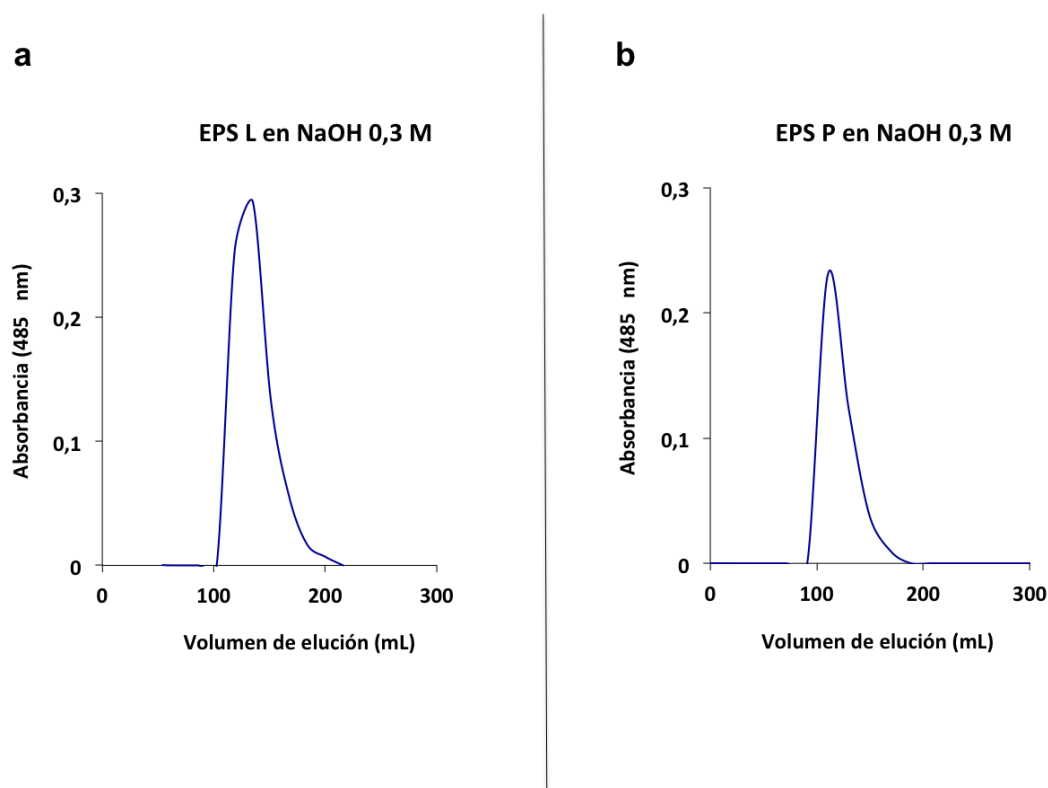


Figura 3. Representación gráfica de los perfiles de elución del EPS L (a) y del EPS P (b).

3.4 Espectros infrarrojos de los EPSs

La espectroscopia de infrarrojos permite obtener información sobre grupos funcionales y otras características estructurales de las sustancias analizadas. Esto se debe a que las sustancias orgánicas presentan frecuencias de grupo características en la región infrarroja, y por tanto la presencia de determinados grupos funcionales en una molécula origina una banda de absorción característica en el espectro de infrarrojo. La espectroscopia de infrarrojos es una técnica primordialmente cualitativa (por ejemplo permite detectar la presencia o ausencia de grupos funcionales).

Los espectros de los EPSs purificados a partir de cultivos de *P. parvulus* 2.6 y *L. lactis* NZ9000[pNGTF] fueron muy similares, típicos de carbohidratos, y mostraron una banda de absorción alrededor de 890 cm^{-1} atribuible, como se esperaba, a β -anómeros (fig. 3).

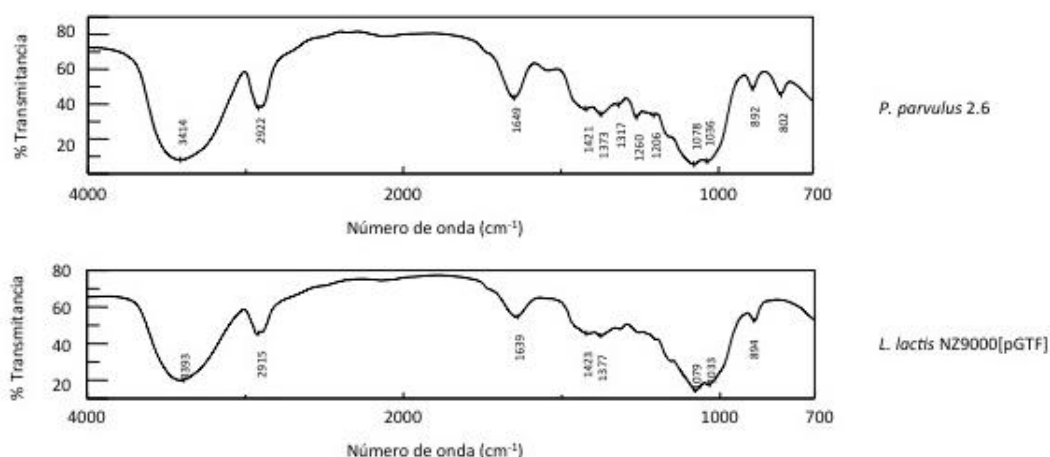


Figura 4. Espectro de infrarrojos de los β -D-glucanos EPS P y EPS L purificados.

3.5 Determinación de los tipos de enlaces de los EPSs

El análisis de metilación del EPS L y del EPS P (tabla 2) demostró la similitud de los biopolímeros producidos por *L. lactis* NZ9000[pNGTF] y *P. parvulus* 2.6, dando los productos esperados para un (1-3)- β -D-glucano ramificado en la posición O-2 de acuerdo con los resultados previos [14, 36].

Tabla 4. Tipo de enlace y porcentaje en los EPSs purificados, deducidos por análisis de metilación.

TIPO DE ENLACE	EPS P	EPS L
GlcP-(1→	30,1	31,1
→3)-GlcP-(1→	37,9	36,7
→2,3)-GlcP-(1→	32,0	32,2

4. DISCUSIÓN

Con el trabajo realizado en este capítulo se ha establecido una combinación de condiciones para producir y purificar (1-3)- β -D-glucanos ramificados en la posición O-2 a partir de cultivos de *P. parvulus* y *L. lactis* con alto rendimiento. La estrategia se basó en la utilización de medios de cultivo, definidos o semi-definidos, así como en la optimización de las condiciones de crecimiento para minimizar la contaminación por otros hidratos de carbono y moléculas bacterianas. Por otra parte, la eficiencia de la precipitación con etanol aplicada a los EPSs de alta masa molecular parece depender de su composición y conformación, así como de la concentración de dicho alcohol [144] y va dirigida a conseguir métodos simples de aislamiento que no interfieran en la determinación de la estructura primaria del EPS. Los resultados obtenidos mostraron que, en el caso del EPS L y el EPS P, precipitaciones con etanol al 70 % fueron adecuadas para recuperar los polímeros. Además, el método de precipitación se combinó con la diálisis con un punto de corte de 12-14 kDa para eliminar totalmente contaminantes de bajo peso molecular, tales como componentes residuales del medio y metabolitos bacterianos. La purificación final de las preparaciones de ambos EPSs se logró mediante fraccionamiento cromatográfico utilizando una columna de Sepharose CL-6B y eluyendo con 0,3 M de NaOH.

Así, en este trabajo se ha estandarizado un procedimiento de aislamiento y purificación de β -D-glucanos a partir de sobrenadantes bacterianos consistente en: (i) concentrar y precipitar los sobrenadantes de cultivo con tres volúmenes de etanol absoluto (para eliminar la fuente de carbono añadida al medio), (ii) después de dos ciclos de re-precipitación con etanol, diálisis, liofilización y disolución en agua; y (iii) purificación y aislamiento de los polímeros por cromatografía, diálisis y liofilización. Este método produjo EPSs puros aptos para su posterior empleo en estudios de inmunomodulación, interactómica y señalización molecular.

CAPÍTULO 2

**Inmunomodulación de los macrófagos humanos M1 y PMA-THP-1 por
los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2**

1. INTRODUCCIÓN

Los β -glucanos producidos por microorganismos y células eucariotas son conocidos por modular la respuesta inmune; y en los casos estudiados, dicha actividad está mediada por receptores específicos incluyendo: el Dectin-1, los TLRs, el CR3 y los SR [105, 123]. En concreto, se ha estudiado la inmunomodulación ejercida por los β -glucanos, aislados de cereales, levaduras, hongos y algas tanto de moléculas lineales $\beta(1-3)$, como de moléculas ramificadas en posición *O*-4 $\beta(1-4)$ o en posición *O*-6 $\beta(1-6)$; y la capacidad inmunomoduladora de BAL y Bifidobacterias productoras de EPSs, tanto homopolisacáridos [32, 33, 145] como heteropolisacáridos [143, 146]. Sin embargo, al inicio de este trabajo, no se disponía de información sobre si, los (1-3)- β -glucanos bacterianos con ramificaciones en posición *O*-2, eran capaces de inmunomodular macrófagos humanos activando alguna vía de señalización.

Para el estudio del efecto inmunomodulador de bacterias, biomoléculas o compuestos orgánicos e inorgánicos, se han empleado modelos *in vitro* e *in vivo*. Entre los modelos *in vivo*, se ha utilizado un modelo de rata Wistar para demostrar que dos EPSs producidos por estirpes de Bifidobacterias pueden modificar el perfil inflamatorio sistémico [147]. Dentro de los modelos *in vitro*, existen diferentes líneas celulares monocitarias humanas en diferentes estadios de maduración que pueden fácilmente diferenciar a macrófagos, como las THP-1, las U937 y las HL-60 [148], y líneas celulares humanas de mucosa intestinal, como las Caco-2 y las HT-29; en las que es posible medir la secreción de citoquinas tras el tratamiento con bacterias y sus EPSs [149].

Existen algunos modelos que permiten detectar respuestas inflamatorias *per se*, así como la alteración de estas debidas a co-tratamientos con agentes pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Uno de los modelos más utilizados, es el cultivo de macrófagos humanos M1 (pro-inflamatorios), derivados de monocitos por tratamiento con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); que ha sido utilizado previamente para el estudio de la respuesta inmune de BAL productoras de los (1-3)- β -glucanos bacterianos con ramificaciones en posición *O*-2 [67, 133].

Por otra parte, la línea celular monocitaria THP-1, se utiliza como un modelo *in vitro* para estudiar la respuesta inmune, dado su parecido con los macrófagos humanos derivados de monocitos [150-152]. El tratamiento con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) induce la diferenciación de estos monocitos a macrófagos PMA-THP-1. Fenotípicamente, los macrófagos inducidos por PMA se asemejan a los macrófagos tisulares residentes (fig. 1) por: la presencia del receptor de alta afinidad FcγRI (CD64), que reconoce las IgGs; la expresión reducida de los antígenos del MHC-II y el aumento de la expresión de receptores del complemento CR3 (CD18-CD11b) y CR4 (CD18-CD11c), que forman parte de la respuesta humoral contra los agentes infecciosos. Además, esta activación de los macrófagos provoca un cambio de su fenotipo, convirtiéndose en células adherentes, y adquiriendo la capacidad para fagocitar y sintetizar y liberar la citoquina inflamatoria TNF-α [148].

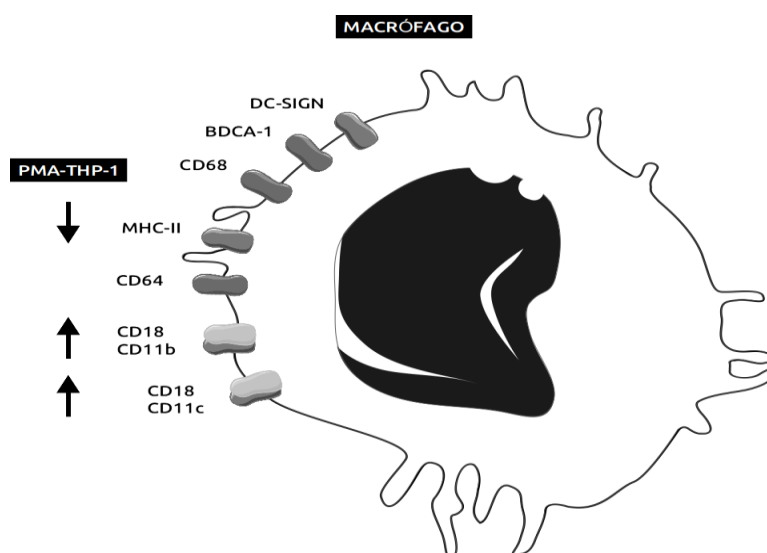


Figura 1. Receptores de membrana característicos de macrófagos humanos. La estimulación de las células monocitarias THP-1 con PMA y su consiguiente diferenciación a macrófagos, lleva a una disminución del MHC-II y un aumento del CR3 (CD18-CD11b) y del CR4 (CD18-CD11c), junto con la detección de la presencia del DC-SIGN, del BDCA-1, del CD68 y del CD64. Estos cambios son responsables de la diferente respuesta y morfología de estas células, respecto a los macrófagos.

Existen algunas diferencias entre macrófagos M1 y células PMA-THP1 diferenciadas; ya que los primeros, cuando están activados, expresan concentraciones más elevadas del FcγRI, de los antígenos MHC-II y poseen mayor capacidad fagocitaria [153]. La expresión aumentada del FcγRI se correlaciona con la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos, y el aumento de la expresión del MHC-II se

correlaciona con una mejora de la capacidad presentadora de antígeno [154]. Este tipo de respuesta también se puede producir en las células PMA-THP-1 al alcanzar el nivel de diferenciación adecuado, tras el tratamiento con el compuesto que se quiera estudiar (como el LPS).

El desencadenamiento de los procesos inflamatorios en estos modelos celulares, a semejanza de lo que ocurre en el organismo, se produce por el reconocimiento, por parte de estas células del sistema inmune, de estructuras y moléculas de microorganismos o sus metabolitos, entre otros. Una de ellas es el LPS, un glicolípido que constituye el componente principal de la membrana externa de bacterias Gram-negativas [155]. La interacción de la fracción del lípido A del LPS con los macrófagos, es responsable de la activación celular y de la liberación de moléculas pro-inflamatorias activas a nivel sistémico (fig. 2).

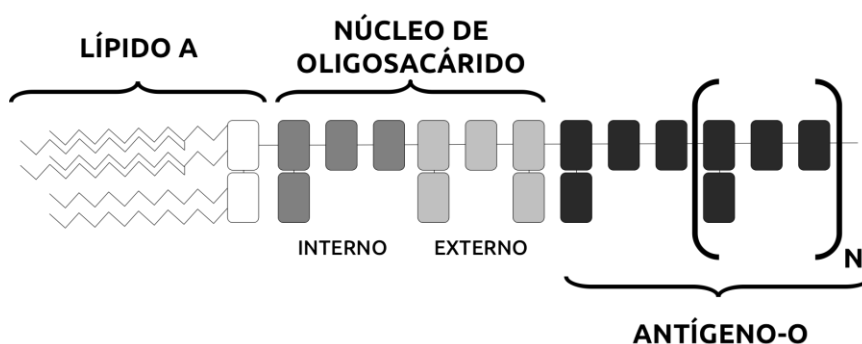


Figura 2. Estructura del lipopolisacárido. El LPS está constituido por tres regiones: el lípido A (cadenas de fosfolípidos unidos a moléculas de glucosamina), responsable de los efectos endotóxicos y que se modula en respuesta a estímulos ambientales; el núcleo de oligosacárido (unido directamente al lípido A), que consta de una parte interna (que participa en la resistencia a compuestos antimicrobianos) y una externa; y el antígeno-O (polímero repetitivo compuesto por glucanos), de longitud variable según la cepa bacteriana y que es la diana de reconocimiento de los anticuerpos.

En la respuesta inmune innata el LPS es un importante activador de macrófagos y células de la microglía [153, 156]. Existen algunas proteínas presentes en las membranas de los macrófagos que son capaces de unir LPS: El LBP (*"LPS binding protein"*); incluyendo también el co-receptor CD14 y la chaperonina M2D, que reclutan el LPS y lo unen a su receptor el TLR-4, desencadenando una cascada de reacciones de señalización, de forma dependiente o no de MyD88 (*"myeloid differentiation primary response gene 88"*) (fig. 3). A través de MyD88, se produce

una inducción de citoquinas pro-inflamatorias con la rápida activación del NFκB y de la vía de la MAPK; que interacciona con quinasas y sustratos de otras vías como ERK ½ (*“extracellular signal-regulated kinase”*), JNK (*“jun N-terminal kinase”*) y p38, y cuya finalidad es inducir la transcripción de genes específicos, a través de la modulación de diversos factores de transcripción, regulando funciones celulares importantes como: proliferación y diferenciación, supervivencia y apoptosis [157]. Sin embargo, el mecanismo independiente de MyD88 lleva a una activación más lenta del NFκB y de la MAPK, induciendo genes relacionados con el IFN y llevando a la maduración de células dendríticas.

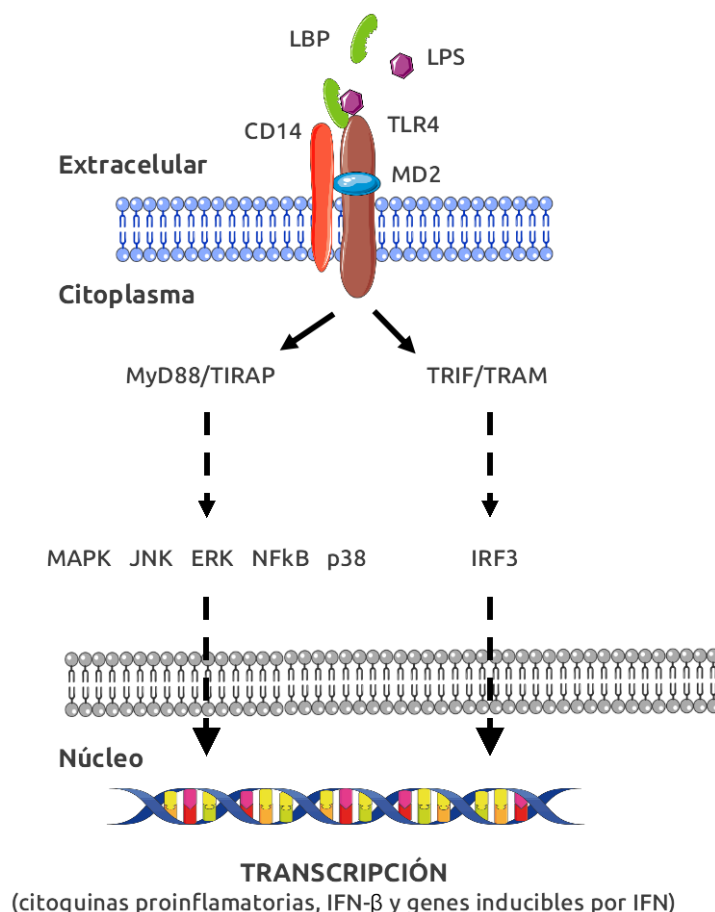


Figura 3. Señalización inducida por el LPS en macrófagos humanos. El LPS es reconocido por la LBP, que junto con la chaperonina MD-2, lo une al co-receptor CD-14 del TLR-4 para activar vías de señalización (de forma dependiente o independiente de MyD88). TIRAP (*“TIR domain containing adaptor protein”*), TRIF (*“TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β”*), TRAM (*“TIR domain-containing adapter molecule 2”*), IRF3 (*“Interferon regulatory factor 3”*). Adaptado de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) [124].

Debido al papel estimulador del LPS, en este trabajo, se ha utilizado dicho lipopolisacárido de cepas de *E. coli* como control de activación de procesos

inflamatorios en diferentes líneas celulares, con el objetivo de determinar la influencia de dos (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2 (el EPS L y el EPS P) en un modelos *in vitro* de inmunomodulación de macrófagos humanos. Así, se valoraron los efectos de los polímeros sobre la actividad celular a nivel de la producción de citoquinas y de la fosforilación de quinasas implicadas en vías de transducción de señal. Además, también se ha analizado la capacidad de interacción del polímero con el receptor Dectin-1, en un modelo *in vitro* de células transfectadas establemente con la construcción quimérica Dectin-1-CD3 ζ .

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Producción y purificación de los EPSs

Se utilizaron dos cepas productoras de (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2: *P. parvulus* 2.6, bacteria aislada a partir de sidra ahilada [14] y la estirpe recombinante *L. lactis* NZ9000[pNGTF], que expresa la glicosil transferasa GTF de *P. parvulus* 2.6 GTF responsable de la síntesis de su (1-3)- β -D-glucano, de forma inducible y controlada por la adición de nisina al medio de cultivo [36].

Los EPSs se produjeron, purificaron y analizaron según el protocolo descrito en el capítulo 1 de este trabajo. Brevemente, los polímeros se obtuvieron por precipitación con etanol a partir de los sobrenadantes de los cultivos de *P. parvulus* 2.6 (EPS P) y *L. Lactis* NZ9000[pNGTF] (EPS L), y después se purificaron re-precipitando con etanol, por diálisis y por fraccionamiento cromatográfico de exclusión molecular. La contaminación por DNA, RNA y proteínas se cuantificó por fluorimetría con el equipo y la tecnología Qubit 2.0 (Invitrogen-Life Technologies), cuyo límite de detección es 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA, 20 ng mL^{-1} de RNA, y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas.

2.2. Cultivos celulares

2.2.1 Los macrófagos M1

Para obtener los macrófagos M1, derivados de monocitos humanos a partir de donantes sanos, en primer lugar, se aislaron las células mononucleares periféricas de

sangre humana (PBMC) de capas leucocitarias con los tubos “*Lymphoprep*” (Nycomed Pharma) de capas leucocitarias, de acuerdo con los procedimientos estándar de gradiente diferencial.

Los monocitos se purificaron a partir de PBMC, mediante separación celular magnética usando microperlas CD14 (Miltenyi Biotec), y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) con 1000 U mL⁻¹ de GM-CSF (ImmunoTools). Los monocitos fueron cultivados a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células mL⁻¹ (> 95% de células CD14⁺), durante 7 días a 37 °C en una atmósfera enriquecida con 5 % de CO₂. El GM-CSF permite diferenciar monocitos a macrófagos M1 [158]; y se añadió, durante el desarrollo del experimento, cada 2 días.

2.2.2 La línea celular humana THP-1

Las células THP-1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con: 10 % de FBS, 100 U mL⁻¹ de penicilina (Gibco) y 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (Gibco); y se incubaron a 37 °C en una cámara de incubación anaeróbica, con una atmósfera conteniendo 5 % de CO₂.

Para la diferenciación y obtención de macrófagos, las células THP-1 se trataron durante 72 h con medio RPMI 1640 suplementado con 40 nM de PMA (Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon) a una concentración de 5×10^5 células por pocillo. Después de la diferenciación, las células no adheridas se retiraron por aspiración, y los macrófagos adheridos (PMA-THP-1) se lavaron dos veces con medio RPMI 1640.

2.2.3 Estimulación de la inflamación en los macrófagos PMA-THP-1

La respuesta inflamatoria frente al LPS de *E. coli* puede ser diferente según el serotipo bacteriano empleado, pudiendo ser más o menos elevada [159]. Por ello se estudió el efecto de tres LPS obtenidos de tres serotipos diferentes de *E. coli* (0111:B4; 0127:B6 y 026:B6) sobre las células PMA-THP-1; con el fin de seleccionar aquel que produjese cambios similares a la estimulación de macrófagos humanos con el serotipo 0111:B4 (fig. 4).

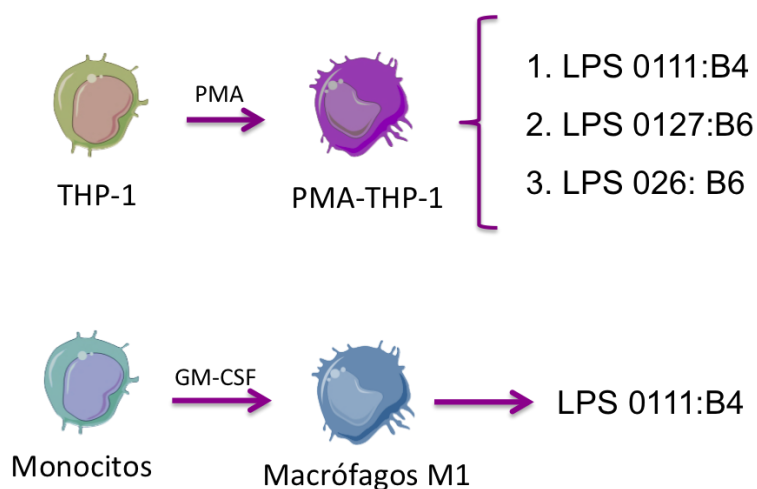


Figura 4. Estimulación de macrófagos con LPS. Se evaluó la acción de 3 LPSs sobre los PMA-THP-1 para determinar cuál era el más adecuado para alcanzar el nivel óptimo de estimulación pro-inflamatoria, comparable a la obtenida sobre los macrófagos M1.

Las células PMA-THP-1 se cultivaron a una concentración de 5×10^5 células mL^{-1} por pocillo, en placas de 24, y se trataron con los LPS (Sigma) a concentraciones en un rango de $0,01$ - $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, durante 24 h a 37°C , en una atmósfera enriquecida con 5 % de CO_2 . Al finalizar el tratamiento se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares para estudios posteriores.

2.3 Ensayo de citotoxicidad

Para comprobar los posibles efectos deletéreos de los tratamientos con los β -glucanos en los modelos *in vitro*, se determinó la viabilidad celular mediante el Kit de proliferación XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-tetrazolio-5-carboxanil) (Hoffman-La Roche), siguiendo el protocolo de la empresa proveedora.

Los macrófagos M1 y PMA-THP-1 se cultivaron durante 24 h a una concentración de 1×10^5 células por pocillo, en una placa de 96, con medio RPMI suplementado. Después, se aspiró el medio de cultivo y las células se trataron con los EPSs objeto de estudio durante 24 h. Se utilizaron concentraciones en un rango de 1 - $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ del EPS L o del EPS P (diluidos en medio de Krebs (Sigma-Aldrich)); y como control negativo células no tratadas. Tras el tratamiento, se añadieron 50 μl a cada pocillo de una solución conteniendo los reactivos XTT 1 y XTT 2 (en proporción 1:50), para obtener la formación de formazán; se incubaron durante 3 h los macrófagos y 4 h las

células PMA-THP-1. Tras la incubación, se midió la Abs₄₅₀ en un lector de microplacas (BioRad 680). Todas las incubaciones se realizaron en las condiciones descritas anteriormente.

El cálculo de la viabilidad celular se realizó mediante la cuantificación de la conversión de XTT a formazán, después de la exposición de las muestras a XTT (XTT1 + XTT2). Este cálculo es relativo, pues está referido al control no tratado, que se toma como el 100 % de viabilidad celular. El cálculo se realizó utilizando la siguiente formula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{450\text{nm}} \text{ tratamiento} \times 100}{\text{Abs}_{450\text{nm}} \text{ control}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la viabilidad celular con el método XTT.

2.4 Ensayo de inmunomodulación de macrófagos

Los macrófagos M1 y PMA-THP1 se trataron durante 24 h a 37°C, en una atmósfera enriquecida con 5 % de CO₂.independientemente con cada uno de los EPSs a 100 µg mL⁻¹. Se utilizaron como control positivo de inflamación 10 ng mL⁻¹ de LPS procedente de *E. coli* 0111:B4 o de *E. coli* 026:B6, respectivamente en los experimentos con macrófagos M1 o PMA-THP1. Tras el tratamiento se recogieron los sobrenadantes del cultivo para su posterior análisis.

2.4.1 Determinación de los niveles de citoquinas

Se analizaron los perfiles de expresión proteica de citoquinas de los cultivos celulares en respuesta a los tratamientos con EPSs mediante ELISA OptEIA (BD Pharmingen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los macrófagos fueron el TNF-α, la IL-10 y la IL-12p40.

Se incubaron en los pocillos de placas de 96 Maxisorp (Nunc) durante toda la noche, independientemente 100 µL de cada uno de los anticuerpos frente a TNF-α, IL-10 ó IL-12p40, diluidos según especificación de la casa comercial con tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,5. Al día siguiente, cada uno de los pocillos conteniendo

anticuerpos inmovilizados, se lavó 3 veces con 300 μ L de solución de lavado (PBS 1X, 0,05% Tween-20 (Sigma)) y se incubó 1 h con 200 μ L de solución de bloqueo (PBS 1X, 10% FBS (Sigma)). Después cada pocillo se lavó 3 veces con 300 μ L de solución de lavado y se incubó durante 2 h con 100 μ L del patrón molecular correspondiente (citoquina diluida en solución de bloqueo) o 100 μ L de las muestras problema (diluidas o no). A continuación, cada pocillo se lavó 5 veces con 300 μ L de solución de lavado; tras lo cual se añadieron 100 μ L de la solución detectora (biotina y estreptavidina en solución de bloqueo) y después de 1 h de incubación se lavaron 7 veces con 300 μ L de solución de lavado. Por último, se añadieron a cada pocillo 100 μ L de del sustrato constituido por el reactivo A (peróxido de hidrógeno) y por el reactivo B (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina) en proporción 1:1 y las placas se incubaron durante 20 min. La reacción se paró añadiendo 50 μ L de una solución 2 N de H_2SO_4 , y se midió la Abs_{450} en un lector de microplacas (Biorad 680). Todas las reacciones se realizaron a temperatura ambiente.

Las concentraciones de las citoquinas se extrapolaron utilizando la recta de regresión generada, utilizando los valores de absorbancia de una curva patrón generada en el mismo ensayo con concentraciones conocidas de citoquinas comerciales.

2.4.2 Análisis de las vías de señalización de los macrófagos

La identificación de los efectos del tratamiento con EPSs sobre los macrófagos, fue estudiado mediante la utilización del “array” conteniendo anticuerpos de fosfoquinasas humanas Proteome Profiler (R&D Systems), detectando el estado de fosforilación de 43 quinasas y 2 proteínas relacionadas (tabla 1). En este “array”, los anticuerpos, de captura y los de control, se encuentran unidos por duplicado a membranas de nitrocelulosa, sobre las que se incuban los lisados celulares de interés; para realizar, posteriormente, la detección por quimioluminiscencia de las proteínas unidas.

Tabla 1. Quinasas humanas detectadas con el “Proteome Profiler Array”. Se muestra el nombre de las proteínas y, entre paréntesis, la posición del aminoácido cuya fosforilación es detectada.

PROTEÍNAS Y FOSFORILACIONES DETECTADAS		
Akt (S473)	Hck (Y411)	PRAS40 (T246)
Akt (T308)	HSP27 (S78/S82)	Pyk2 (Y402)
AMPK alpha1 (T174)	HSP60	RSK1/2/3 (S380/S386/S377)
AMPK alpha2 (T172)	JNK pan (T183/Y185, T221/Y223)	Src (Y419)
beta-Catenin	Lck (Y394)	STAT2 (Y689)
Chk-2 (T68)	Lyn (Y397)	STAT3 (S727)
c-Jun (S63)	MSK1/2 (S376/S360)	STAT3 (Y705)
CREB (S133)	p27 (T198)	STAT5a (Y694)
EGF R (Y1086)	p38 alpha (T180/Y182)	STAT5a/b (Y694/Y699)
eNOS (S1177)	p53 (S15)	STAT5b (Y699)
ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187)	p53 (S392)	STAT6 (Y641)
FAK (Y397)	p53 (S46)	TOR (S2448)
Fgr (Y412)	p70 S6 Kinase (T421/S424)	WNK-1 (T60)
Fyn (Y420)	PDGF R beta (Y751)	Yes (Y426)
GSK-3 alpha/beta (S21/S9)	PLC gamma-1 (Y783)	

La detección de las proteínas fosforiladas se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial (fig. 5). Para ello, los macrófagos M1 se incubaron durante 10 min a 37 °C en una cámara de incubación anaeróbica, con una atmósfera conteniendo 5 % de CO₂ en presencia de 100 µg mL⁻¹ del EPS P o del EPS L. Se utilizó el tratamiento con el LPS (10 ng mL⁻¹) como control positivo de inflamación, y como control negativo, macrófagos M1 a los que no se adicionó ningún agente estimulante. Inmediatamente después, los macrófagos se lisaron con tampón de lisis (R&D Systems). Previamente las membranas se dejaron bloqueando con el tampón 1 (R&D Systems) durante 1 h a temperatura ambiente; tiempo tras el cual se eliminó el tampón de bloqueo y se añadieron los lisados celulares a cada membrana, dejando incubar toda la noche en agitador a una temperatura de 28 °C. Las membranas se

lavarón 3 veces con la solución de lavado 1X (R&D Systems), incubando durante 10 min a temperatura ambiente en cada ciclo de lavado. Después, se añadió 1 mL del cóctel A (DAC-A, anticuerpo de detección) a cada una de las membranas A, y se añadió 1 mL del cóctel B (DAC-B) a cada una de las membranas B; dejando incubar durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Le siguió otra fase de lavados, se añadió 1 ml de Estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano) a cada membrana y se incubaron en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se volvieron a lavar las membranas. Finalmente se añadió el “*Chemi Reagent Mix*” y se revelaron las membranas utilizando autoradiografía.

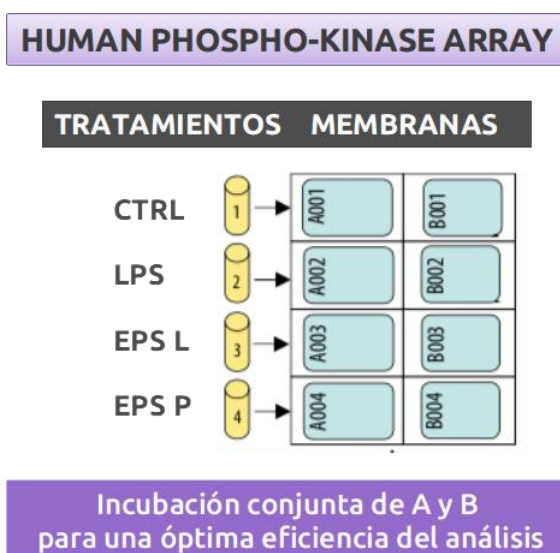


Figura 5. Esquema de trabajo con el “array” de fosforilación. Las membranas A y B contienen 28 y 18 anticuerpos por duplicado, respectivamente, para asegurar una mayor especificidad en la detección de las proteínas fosforiladas.

El análisis de los resultados se realizó mediante densitometría de las autoradiografías, midiendo la intensidad (unidades arbitrarias, AU) de cada punto (proteína hibridada); normalizando la señal frente a los controles positivos internos del “array”.

2.4.3 Análisis bioinformático funcional

Las proteínas de interés, para las cuales se detectó una expresión diferencial entre las muestras control y los tratamientos con los EPSs en los “arrays” de fosfoquinasas, se analizaron con la aplicación bioinformática DAVID 6.7: Base de datos

para la Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), que integra la información de más de 1,5 millones de genes de más de 65.000 especies, procedentes de diferentes fuentes públicas de anotación de genes y proteínas.

Los recursos bioinformáticos de DAVID consisten en una base de conocimiento biológico integrada y unas herramientas analíticas, que permiten extraer, de manera sistemática, el significado biológico de listas de genes/proteínas [160]. Para utilizarlo, se proporciona una lista de genes, que codifican las proteínas de interés, con sus identificadores comunes, y se realiza el análisis con una o más herramientas de exploración de texto y/o rutas como: la clasificación funcional de genes, la gráfica de anotación funcional o el agrupamiento y la tabla de anotación funcional. Siguiendo este protocolo se puede conseguir un conocimiento más profundo de los términos biológicos en los que está enriquecida una lista de genes de un estudio concreto [160].

DAVID hace la clasificación funcional de los genes extrayendo la información de diferentes bases de datos. En este caso se seleccionaron los términos de Ontología Génica (GO) (<http://geneontology.org/>); y los de rutas moleculares integrados en: la Base de Imágenes de Bioquímica Biológica (BBID, <http://bbid.irp.nia.nih.gov/>), Biocarta (<http://www.biocarta.com/genes/index.asp>) y la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>). GO es una iniciativa bioinformática que permite unificar la representación de los atributos de los genes y sus productos entre las especies, favoreciendo la interpretación funcional de datos experimentales; haciendo una división de los términos en 3 categorías: componente celular (partes de la célula o de su espacio extracelular), función molecular (actividades elementales de un producto génico a nivel molecular) y proceso biológico (operaciones o grupo de eventos moleculares con un principio y fin definido, en relación al funcionamiento de unidades de vida integradas: células, tejidos, órganos y organismos). Por otro lado el uso de bases de datos de rutas moleculares permite tener información gráfica de cómo interaccionan los genes y sus productos.

Esta aplicación bioinformática también proporciona información de diferentes parámetros estadísticos, que permiten valorar la significación de la asociación de un término funcional con los genes de estudio, como: el valor p del test Fisher exacto y el valor de la proporción de enriquecimiento en dicho término. Tal valor es el cociente de la proporción del enriquecimiento para un término determinado del grupo de genes proporcionados, dividido por la proporción de la asociación de ese término con todos los genes del organismo que se están estudiando.

Así, para el estudio funcional con DAVID se seleccionaron aquellas proteínas diferencialmente expresadas en los tratamientos con una proporción relativa a los niveles del control, y los términos GO de BP y las rutas KEEG.

2.5 Detección de la interacción de (1-3)- β -glucanos con el receptor Dectin-1

2.5.1 Cultivo de la línea celular B3Z

La utilización de la línea celular B3Z permite estudiar la unión de β -glucanos al receptor Dectin-1, y fue amablemente proporcionada por el Dr. David Sancho del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas (CNIC-CSIC). La línea celular B3Z es un hibridoma de células T transfectadas establemente con la construcción quimérica Dectin-1-CD3 ζ (región extracelular de Dectin-1 fusionada a la región citoplasmática de CD3 ζ). Estas células, además, se transfectan transitoriamente con un gen reportero NFAT-LacZ (factor nuclear NFAT de células T activadas, fusionado al gen lacZ de *E. coli*); ya que CD3 ζ dispara una señal intracelular que conduce a la activación del factor transcripcional NFAT.

Las células se cultivaron a 37°C, en una atmósfera enriquecida con 5 % de CO₂ en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 2 mM de glutamina, 200 U mL⁻¹ de penicilina, 200 mg mL⁻¹ de estreptomicina, 50 mM de 2-mercaptoethanol (Invitrogen), y 10 % de FBS.

2.5.2 Inmovilización de los ligandos y determinación de la actividad β -galactosidasa

Los ligandos se inmovilizaron en placas de microtítulo de 96 pocillos Maxisorb (Nunc). Para ello, se agregaron 200 μ l de una solución a 62,5 ng mL⁻¹ del EPS P, del EPS L, o de cada uno de los controles positivo (zymosan y laminarina) (Sigma), disueltos en el tampón PBS, pH 7. Las soluciones utilizadas se prepararon por dilución de una solución preparada a 1 mg mL⁻¹. La placa se incubó durante 17 h a 4 °C, y posteriormente los pocillos se lavaron 2 veces con 200 μ l de solución de lavado (PBS 1X, pH 7 y 0,05 % Tween 20 (Sigma)).

Una vez realizada la unión de los ligandos a los pocillos de la placa, sobre ellos se sembraron las células B3Z a una concentración de $2,5-5 \times 10^5$ células mL⁻¹ por pocillo, se incubaron durante toda la noche a 37°C, en una atmósfera enriquecida con 5 % de CO₂, y posteriormente se realizó el ensayo para determinar la actividad β -galactosidasa (β -gal). El ensayo utilizado proporciona un método sencillo, rápido y muy sensible para la determinación de la actividad β -gal en células transfectadas con una construcción que expresa β -gal (gen reportero), catalizando la hidrólisis de un análogo del galactósido: clorofenol rojo- β -D-galactopiranosido (CPRG), que posteriormente se mide espectrofotométricamente, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Así, tras la incubación de las células con los ligandos, se centrifugó la placa durante 5 min y se descartó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 100 μ l de CPRG 1X (Roche) a cada pocillo, se incubaron durante 4 h a 37 °C, y se midió la Abs a 565-595 nm en un lector de microplacas (Biorad 680).

La valoración de la actividad β -gal expresada como: U mg⁻¹ de proteína, se calculó por la conversión del CPRG catalizada por la β -gal [161].

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con Prism 5.0 (GraphPad). Los datos se sometieron al test de normalidad de D'Agostino & Pearson. El nivel de significación de los valores paramétricos se analizó con el test t de Student de dos colas para datos pareados, mientras para valores no paramétricos se empleó el test de Wilcoxon.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto de los EPSs sobre la actividad metabólica de macrófagos humanos

Para analizar los posibles efectos funcionales de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición O-2, se emplearon los polímeros purificados EPS P y EPS L sintetizados, respectivamente, por *P. parvulus* 2.6 y *L. lactis* NZ9000[pNGTF]. Con ellos se trataron macrófagos humanos M1 y PMA-THP-1.

El análisis con el kit de proliferación del XTT, no mostró ningún efecto perjudicial de los tratamientos con los EPSs sobre la viabilidad celular de ambos tipos celulares (fig. 6). A ninguna de las concentraciones de los EPSs utilizadas, el porcentaje de supervivencia fue inferior al del control no tratado (100 %). Además, se observó que el tratamiento con los EPSs afectaba a la respiración celular en los macrófagos M1; ya que concentraciones elevadas del EPS P (50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y del EPS L (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) produjeron un aumento significativo de la actividad metabólica ($p < 0,05$). Sin embargo, estos efectos no se reflejaron en las células PMA-THP-1.

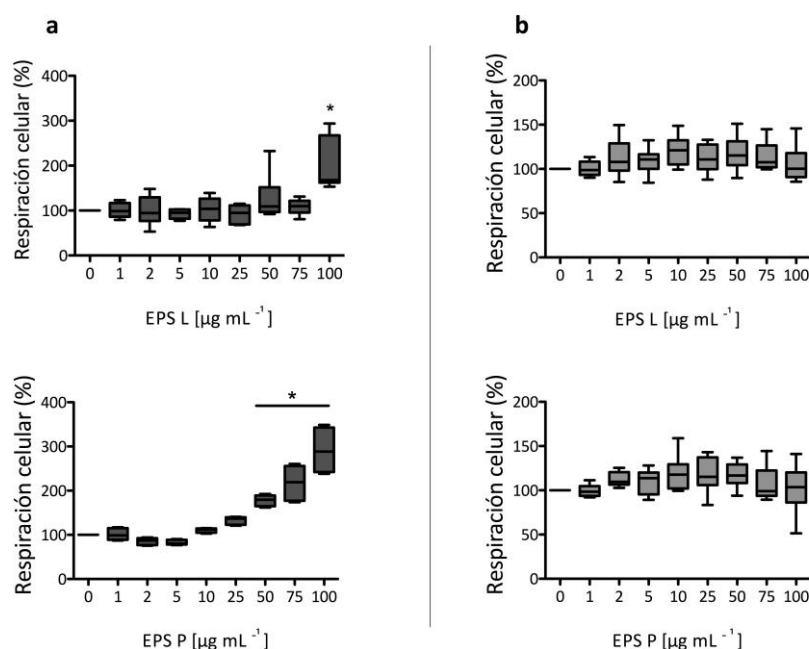


Figura 6. Ensayo XTT en macrófagos M1 (a) y PMA-THP-1 (b). El análisis del efecto del tratamiento con los EPSs en la activación del metabolismo celular, no mostró efectos deletéreos para las células. Sin embargo, concentraciones elevadas de los EPSs activaron el metabolismo de los macrófagos M1. *Significación estadística, $p < 0,05$.

En base a estos resultados, y para experimentos posteriores, se utilizaron los EPSs a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2 Influencia de los LPSs de distintos serotipos de *E. coli* sobre la respuesta inflamatoria de los macrófagos PMA-THP-1

Seguidamente, fue necesario poner a punto el modelo *in vitro* de evaluación de inflamación, tan sólo para los macrófagos PMA-THP-1 puesto que para los M1 se utilizó un protocolo ya estandarizado en el laboratorio. Así, se evaluó el efecto inflamatorio de los LPSs de tres distintos serotipos de *E. coli* sobre los PMA-THP-1, valorando la concentración del TNF- α en los sobrenadantes de las células estimuladas. El tratamiento con cada uno de los tres tipos de LPS desencadenó una respuesta dosis-dependiente, siendo esta más elevada en los macrófagos estimulados con el LPS serotipo 026:B6 (fig. 7).

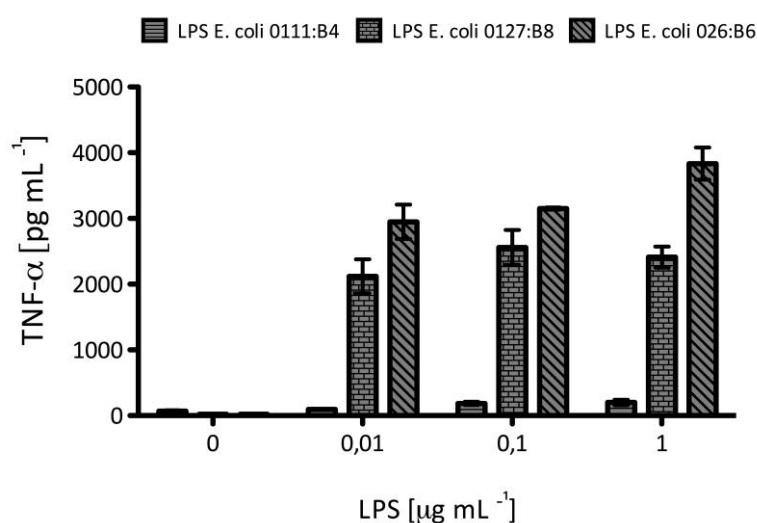


Figura 7. Respuesta de los macrófagos PMA-THP-1 al tratamiento con el LPS de distintos serotipos de *E. coli*. Los niveles del TNF- α sirvieron para valorar el grado de inflamación, observándose que a diferentes dosis el serotipo 0111:B4 no mostró un efecto diferencial, mientras que los serotipos 0127:B8 y 026:B6 tuvieron un efecto dosis-dependiente sobre la producción del TNF- α , siendo mayor para este último.

3.3 Efecto de los EPSs en la regulación de la inflamación por los macrófagos M1 y PMA-THP-1

Se investigó la influencia de los (1-3)- β -D-glucano ramificado en posición *O*-2 en comparación con el efecto del EPS de sobre la producción de citoquinas por los macrófagos M1 y PMA-THP-1.

El tratamiento con el LPS desencadenó el proceso inflamatorio en ambos modelos celulares, estimulando la producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias ($p < 0,05$) (fig. 8), de manera similar a lo encontrado en trabajos previos [162, 163].

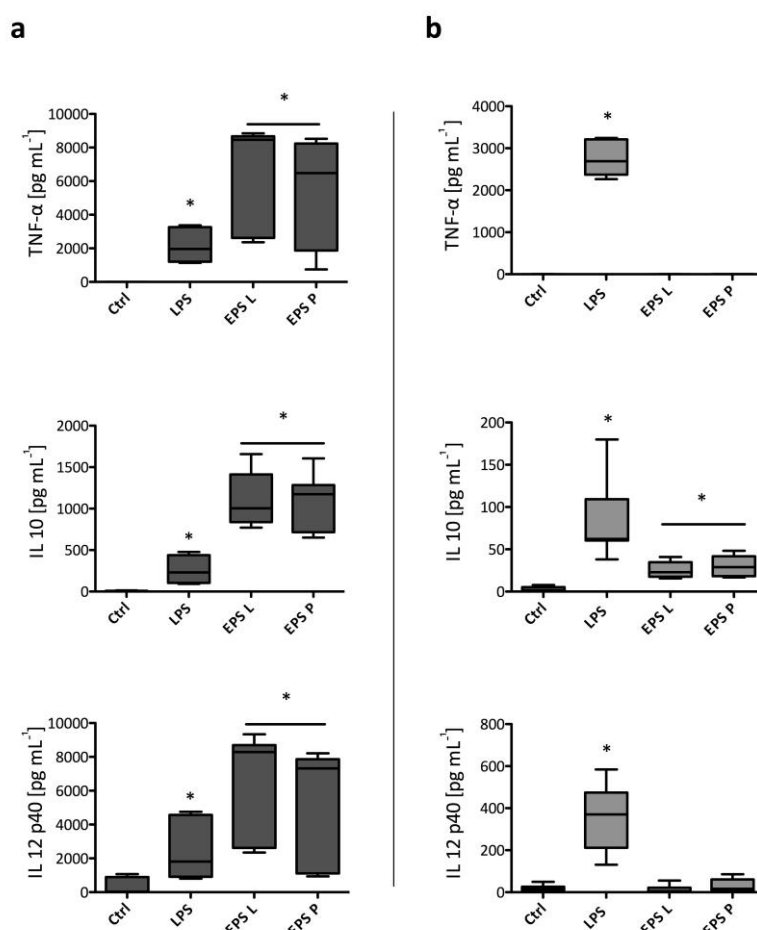


Figura 8. Efecto de los tratamientos con el LPS y los EPSs en los niveles de citoquinas secretados por los macrófagos M1 (a) y PMA-THP-1 (b). Se observó una respuesta a los tratamientos mayor en los macrófagos M1 que en los PMA-THP-1. En estos últimos el LPS contribuyó eficazmente a incrementar los niveles de las citoquinas . *Significación estadística, $p < 0,05$.

En el caso de los dos EPSs, ambos desencadenaron la secreción de las citoquinas por los macrófagos M1 a niveles significativamente superiores a los inducidos por el LPS ($p < 0,05$) (fig. 8a). Al comparar la relación pro-inflamatoria TNF- α /IL-10, se detectó un mayor efecto pro-inflamatorio (por mayor producción de TNF- α) del tratamiento con el LPS, respecto al provocado por los EPSs. Alternativamente, los macrófagos PMA-THP-1 mostraron, respecto a los M1, una respuesta diferencial al tratamiento con los EPSs (fig. 8b). Así, los niveles de las tres citoquinas producidas por los PMA-THP-1 en presencia de los EPSs fueron inferiores a los detectados en presencia del LPS. Sin embargo, si se observó un aumento significativo de los niveles de la IL-10 tras el tratamiento con los EPSs respecto al control negativo no tratado ($p < 0,05$); que no se detectó sobre la producción del TNF- α o de la IL-12p40.

3.4 Análisis de la capacidad de unión de los EPSs al receptor Dectin-1

Ya que en estudios previos se detectó la unión de un número elevado de (1-3)- β -D-glucanos lineales y ramificados al receptor Dectin-1 [123], se procedió a estudiar si los EPSs eran capaces de activar la transducción de señales provocada por la unión de EPSs a dicho receptor. Para ello, se utilizó el hibridoma de células T (B3Z) que expresa la región extracelular del Dectin-1 acoplada a la región intracelular del receptor CD3 ζ , que activa el factor de transcripción NFAT fusionado con LacZ; y así valorar dicha activación a través de la determinación de la actividad β -gal. Para verificar los resultados se utilizaron los controles: negativo (no tratado) y positivos (los ligandos de Dectin-1: el zymosan de *S. cerevisiae*, que contiene un β -D-glucano con unidades repetitivas de glucosa, conectadas por uniones $\beta(1-3)$ -glicosídicas; y la laminarina de *L. digitata*, glucano con uniones $\beta(1-3)$, con sustituciones en posición O-6).

Los hibridomas tratados con el zymosan o la laminarina mostraron una elevada actividad β -gal (fig. 9), confirmando por tanto, que son ligandos del Dectin-1 y la idoneidad del ensayo utilizado. Sin embargo, el tratamiento con el EPS L y con el EPS P no produjo un incremento de los niveles de β -gal en los hibridomas (fig. 9); indicando que el receptor Dectin-1 no es un receptor para los (1-3)- β -D-glucanos

ramificados en posición *O*-2 y que los efectos provocados por los EPSs a nivel celular deberían estar mediados por otro tipo de receptor.

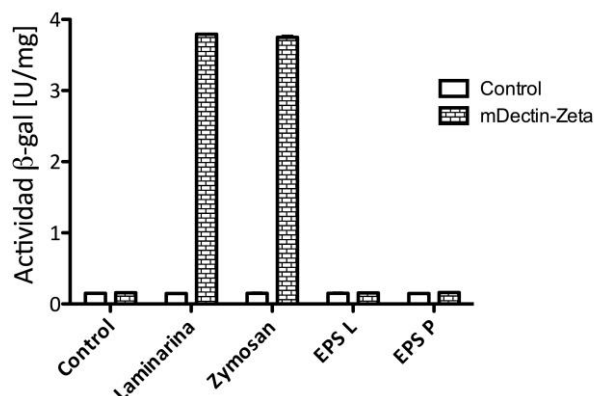


Figura 9. Actividad β-galactosidasa de la línea celular quimérica B3Z Dectin-1 CD3 ζ. La transfección con el gen reportero NFAT-LacZ permitió detectar la unión de ligandos al receptor Dectin-1, por valoración de la actividad β-gal. Sólo los controles positivos (laminarina y zymosan) mostraron la capacidad de activar el receptor, y por tanto la expresión de la fusión NFAT-LacZ.

3.5 Influencia de los EPSs sobre las vías de señalización de los macrófagos M1

Ya que no se detectó capacidad de unión de los EPSs al receptor Dectin-1 se utilizó otra aproximación para estudiar el origen del efecto inmunomodulador de los polímeros. Para ello, utilizando los macrófagos M1, se analizó la influencia de los EPSs en la activación/fosforilación de 46 quinasas intracelulares; y así poder conocer más sobre las vías de señalización potencialmente activadas.

El análisis de los resultados del “array” de fosforilación mostró diferencias en los niveles de activación de diversas quinasas humanas (figs. 10 y 11), en respuesta a los tratamientos con el LPS y los EPSs. El análisis densitométrico de estos cambios, mostró un incremento significativo de los niveles de fosforilación de Fyn, FAK, AKT(T308) y p70S6K, en el caso de ser tratados con el EPS L o con el EPS P (fig. 11). Además, los niveles de fosforilación de ERK1/2, MSK1/2, AKT (S473), JNKpan y p38, fueron superiores en las células tratadas con el LPS. Estos resultados indicaron que los EPSs activan rutas de señalización diferentes a las del LPS.

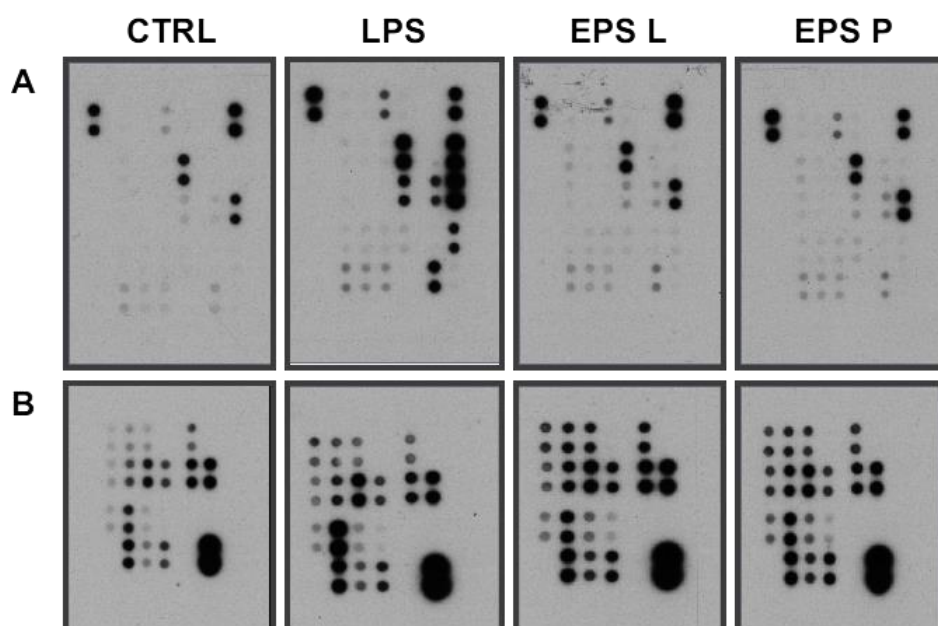


Figura 10. Detección de niveles de proteínas quinasas fosforiladas. Se muestran las 2 parejas de membranas A y B, que responden a diferentes tratamientos, produciendo mayor o menor señal de hibridación de las diferentes proteínas. Se observan ciertas muestras intensamente hibridadas que reflejan las posiciones de control positivo en la membrana.

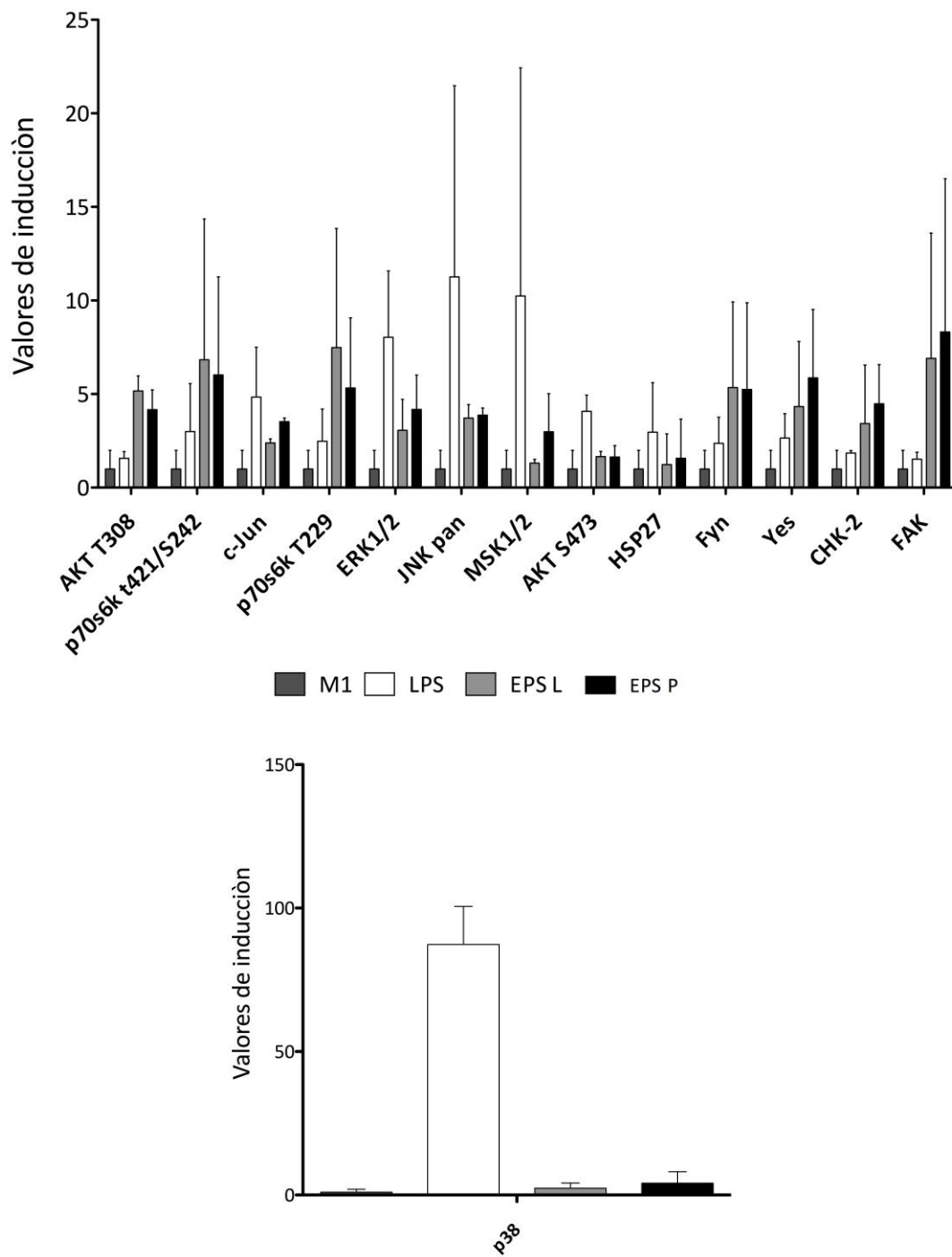


Figura 11. Niveles de proteínas quinasas afectadas por los tratamientos. Se representa el cociente de los niveles de cada una de las proteínas fosforiladas en cada tratamiento, respecto a los niveles del control no tratado. Se representan aquellas proteínas que mostraron un factor de inducción > 3.

3.6 Estudio funcional de las vías de señalización de macrófagos M1 estimuladas por los EPSs

Cuando se analizaron los resultados de los niveles de fosforilación de las quinasas (figs. 10 y 11), se detectaron 14 proteínas con expresión diferenciada tras los diferentes tratamientos (factor de inducción > 1,2 respecto al control no tratado): con los EPSs (7) y con el LPS (7) (tabla 2). Con el uso de la herramienta bioinformática DAVID, se pudo extrapolar información funcional sobre estas proteínas que se habían activado diferencialmente en macrófagos humanos M1; empleando términos GO de BP y rutas moleculares de KEGG para homogeneizar los resultados, y un rigor de clasificación alto para destacar sólo aquellos procesos más significativos (teniendo en cuenta que todas eran fosfoproteínas).

Tabla 2. Proteínas con fosforilación alterada debido a los tratamientos con los EPSs o con el LPS. Se muestran aquellas proteínas con un factor de inducción > 3 respecto al control. En el caso de la proteína AKT destaca su expresión elevada provocada tanto por el LPS como por los EPSs, pero en posiciones de fosforilación diferentes.

PROTEÍNA	TRATAMIENTO		
	LPS ^a	EPS L ^a	EPS P ^a
p38	87,31	2,31	4,14
JNK pan	11,26	3,72	3,88
MSK1/2	10,24	1,31	2,99
ERK1/2	8,04	3,06	4,18
c-Jun	4,84	2,39	3,53
AKT S473	4,08	1,66	1,64
HSP27	2,96	1,23	1,56
p70s6k T421/S242	3,00	6,83	6,02
Yes	2,64	4,33	5,86
p70s6k T229	2,47	7,48	5,33
Fyn	2,37	5,35	5,25
CHK-2	1,85	3,43	4,48
AKT T308	1,57	5,17	4,17
FAK	1,52	6,92	8,32

^a Para cada tratamiento se refleja el factor de inducción (respecto al control no tratado).

Cuando se emplearon, para el análisis con los recursos bioinformáticos de DAVID, todas las proteínas con niveles de fosforilación alterado las asociaciones fueron con términos relacionados con fosforilación (fig. 12) y su papel en procesos metabólicos (fig. 13); presentando, como era de esperar, un enriquecimiento alto para esta combinación.

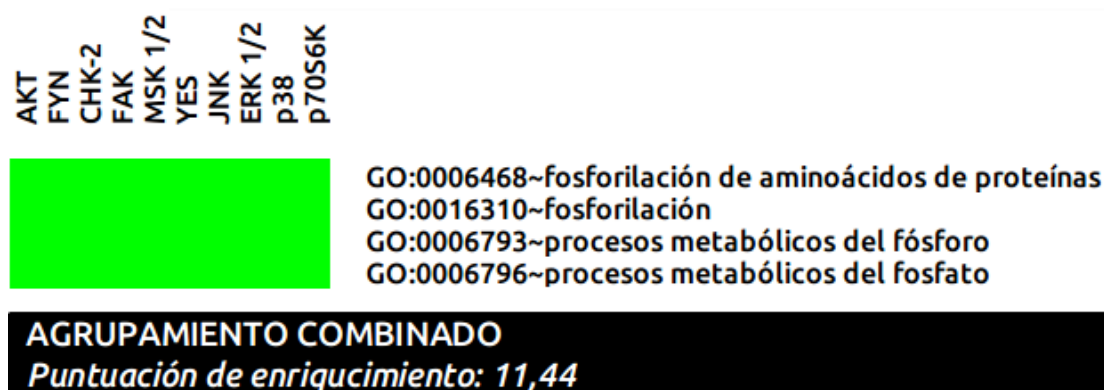


Figura 12. Agrupamiento funcional combinado de los genes con expresión alterada por el tratamiento con los EPSs y el LPS. Se muestran los términos frente a los que se asocian significativamente ($p < 0,05$) los genes representados (tanto con expresión reprimida como sobre-expresados debido a los tratamientos). La asociación de estas proteínas con los términos GO (relacionados con fosforilación de proteínas), obtuvo un valor de enriquecimiento elevado. El color verde indica la asociación positiva gen-término, mientras que el color negro indica que no hay referencias respecto a dicha asociación. El valor de enriquecimiento indica el grado en el que el agrupamiento está representado frente a la lista de todos los genes.

Al mismo tiempo, cuando se analizaron individualmente los resultados del agrupamiento, se observó cómo todos los términos fueron significativos para la asociación presentada, y que además presentaban un grado de asociación muy elevado (tabla 3).

Tabla 3. Términos del agrupamiento combinado para los EPSs y el LPS. Se presentan los términos estadísticamente significativos del agrupamiento ($p < 0,05$) con su valor de enriquecimiento. Todos los términos representados están relacionados con procesos de fosforilación en rutas metabólicas, con un valor de enriquecimiento elevado.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0006468~fosforilación de aminoácidos de proteínas	17,38
GO:0016310~fosforilación	14,94
GO:0006793~procesos metabólicos del fósforo	11,92
GO:0006796~procesos metabólicos del fosfato	11,92

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

Al analizar los resultados obtenidos para las proteínas que se activaron solamente con el tratamiento con el LPS, se observó un comportamiento funcional diferente; en el cual las proteínas, se mostraron agrupadas entorno a procesos de muerte celular, con una puntuación de enriquecimiento de 3,13 (fig. 13).

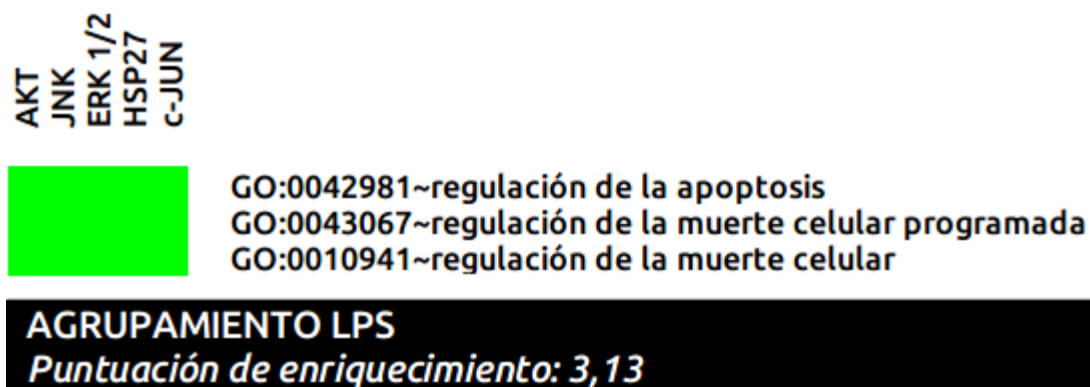


Figura 13. Agrupamiento funcional de los genes activados por el tratamiento con el LPS. Todos los términos GO destacados pertenecen a procesos de muerte celular programada.

Individualmente estos términos presentaron valores similares y elevados; tanto para la significación estadística, como para el enriquecimiento relativo (tabla 4).

Tabla 4. Términos del agrupamiento para el LPS. Los términos GO asociados a la respuesta al LPS de los macrófagos M1 humanos están exclusivamente relacionados con muerte celular en general y apoptosis en concreto.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO^a
GO:0042981~regulación de la apoptosis	9,35
GO:0043067~regulación de la muerte celular programada	9,26
GO:0010941~regulación de la muerte celular	9,22

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

El tratamiento con los β -glucanos bacterianos, mostró un comportamiento similar, para el EPS L y para el EPS P, en la respuesta a la fosforilación de proteínas quinasas humanas. De modo que, el análisis funcional se realizó integrado para ambos.

De esta forma, la agrupación de estas proteínas, se asoció con un agrupamiento de sólo 3 miembros relacionados con procesos de movilidad celular (fig. 14); que podrían estar indicando procesos de diferenciación de macrófagos, tras el tratamiento.

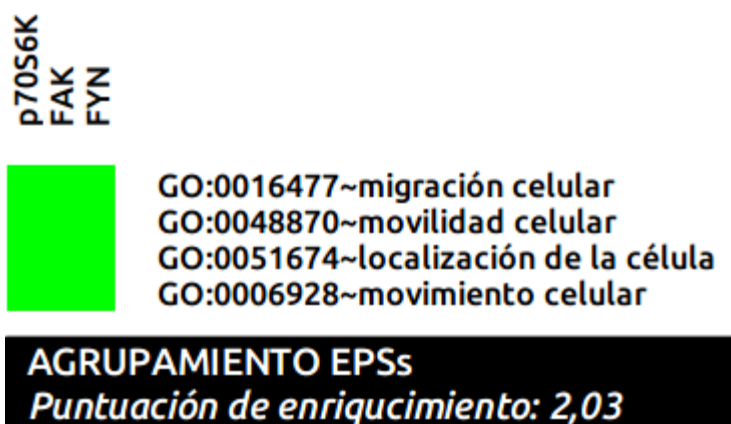


Figura 14. Agrupamiento funcional de los genes activados por el tratamiento con los EPSs.

El análisis pormenorizado de estos términos de asociación, mostró un claro enriquecimiento para los procesos de migración y movilidad, con unos enriquecimientos relativos muy elevados (tabla 5).

Tabla 5. Términos del agrupamiento para los EPSs. La respuesta de los macrófagos al tratamiento con los EPSs, activó proteínas relacionadas significativamente con mecanismos de migración celular.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0016477~migración celular	24,51
GO:0048870~movilidad celular	22,03
GO:0051674~localización de la célula	22,03
GO:0006928~movimiento celular	14,24

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

4. DISCUSIÓN

Como se ha descrito en el capítulo anterior, y en los resultados de Notararigo et al. (2013) [144], se puso a punto un protocolo para obtener dos (1-3)- β -D-glucanos puros, ramificados en posición *O*-2, y producidos *in vivo* por la glicosiltransferasa GTF de *P. parvulus* 2.6, en el hospedador original (EPS P) y en la bacteria recombinante *L. lactis* NZ9000[pNGTF] (EPS L); lo que permitió iniciar en este capítulo el estudio de la influencia de estos biopolímeros sobre la respuesta inmune innata, y comenzar a identificar las posibles vías de señalización activadas.

Con el fin de estudiar los efectos inmunomoduladores de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2 sintetizados por BALS, se han utilizado, en este trabajo,

dos modelos *in vitro* de macrófagos, que permiten evaluar respuestas relacionadas con procesos inflamatorios, los M1 pro-inflamatorios y los PMA-THP-1.

El estudio de la influencia de los EPSs sobre la viabilidad celular de los macrófagos mostró que los EPSs no son citotóxicos para ninguno de los dos tipos celulares estudiados (fig. 7). Sin embargo, mientras que los polímeros, a concentraciones elevadas, provocaban una estimulación del metabolismo celular en los macrófagos M1, no se detectó esta estimulación sobre las células PMA-THP-1. Esta respuesta diferencial podría estar relacionada con la existencia de un estadio de activación más avanzado en los macrófagos M1, respecto a las células PMA-THP-1. Cabe resaltar, que tanto los macrófagos M1 como las células PMA-THP-1, carecen de capacidad de proliferar a raíz de su diferenciación *in vitro* [150]; por lo que, los resultados obtenidos con los ensayos de viabilidad celular, representan una valoración de la tasa metabólica celular y no de su grado de proliferación.

En este trabajo, se ha evaluado la respuesta celular de los PMA-THP-1 frente a 3 LPS de distintos serotipos de *E. coli*; para seleccionar aquel que provocara una respuesta pro-inflamatoria similar a la observada en los M1, estimulados con el serotipo 0111:B4. La determinación de los niveles de TNF- α producidos por los PMA-THP-1 reveló que el LPS 026:B6 era el más estimulante (fig. 8); además, se obtuvieron por tratamiento de PMA-THP-1 con LPS 026:B6 y M1 con LPS 0111:B4 (fig. 7), niveles del TNF- α similares (3.000-3.500 pg mL⁻¹ a una concentración de LPSs de 10 ng mL⁻¹). La activación de la inflamación en ambos tipos de macrófagos, se confirmó con niveles elevados de la IL-12p40 en respuesta al tratamiento con el LPS.

Respecto a los EPSs, ambos fueron capaces de estimular a los M1, y el balance neto de la estimulación (TNF- α /I-L10), indicó un efecto anti-inflamatorio (fig. 8a). Sin embargo, en el caso de las células PMA-THP-1, el tratamiento con los EPSs sólo provocó un incremento significativo de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (fig. 8b). La diferencia en la respuesta de los dos tipos de macrófagos, se correlacionó con los resultados obtenidos respecto a la mayor influencia de los (1-3)- β -D-glucanos con sustitución en posición O-2 sobre el metabolismo celular de los M1, que indicaba

una mayor activación de estos que de las células PMA-THP-1 (fig. 8). Estos resultados podrían, a su vez, estar relacionados con la menor respuesta a estímulos de las células PMA-THP-1; dado que, se ha demostrado que su respuesta se ve afectada por el tiempo de tratamiento del cultivo con PMA. Así, la adición de un paso de reposo sin PMA a las células THP-1, entre su inducción con PMA y el tratamiento, podría mejorar su respuesta al mismo [164]. Además, como se ha comentado previamente, las células PMA-THP-1 son células diferenciadas, que presentan los principales receptores presentes en los macrófagos [148, 154]; por lo que, su menor activación, podría ser fruto de un problema de reconocimiento de los EPSs. No podría descartarse que el protocolo de diferenciación tenga una contribución negativa en el número de representantes de dichos receptores, o que estas células no se hayan diferenciado completamente para reconocer este tipo de molécula. Teniendo en cuenta todos estos datos, los resultados demostraron un efecto anti-inflamatorio de los (1-3)- β -D-glucanos bacterianos en ambos modelos *in vitro* de inflamación de macrófagos, rebajando la proporción de citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias.

Con el objetivo de intentar comenzar a establecer las vías de señalización de los EPSs, se evaluó su capacidad de activar la vía mediada por el receptor más característico de los (1-3)- β -glucanos, la de Dectin-1. Los resultados mostrados en la figura 9, no revelaron una interacción ni del EPS L ni del EPS P con Dectin-1, y sí con los controles positivos (laminarina y zymosan). Se descartó la existencia de un problema técnico del método utilizado, que requiere una unión de los EPSs analizados a una placa de pocillos múltiples; puesto que, con esas mismas condiciones de inmovilización, se ha conseguido establecer, en nuestro laboratorio, un método ELISA específico para evaluar las concentraciones de los (1-3)- β -glucanos con ramificaciones O-2 [65]. Sin embargo, sí es factible que los EPSs posean una baja constante de afinidad hacia el Dectin-1, y que, por tanto, el sistema de detección usado no tuviese la sensibilidad suficiente; o bien, que exista un efecto indirecto debido a otro receptor. Además, el receptor Dectin-1 es capaz de dimerizar con TLR-2 [123], por lo que los EPSs podrían ser ligandos del heterodímero ausente en el ensayo utilizado. También, la naturaleza de los EPSs estudiados, podría ser

responsable de la falta de unión a Dectin-1. Los EPSs son moléculas altamente polidispersas, y a diferencia de la laminarina (20 kDa) tienen elevada masa molecular ($> 10^6$ kDa) (capítulo 1 y Werning et al., 2014) [65]; las moléculas se hidratan con agua o PBS, pero, debido a su masa molecular, forman una suspensión de EPSs y no una solución. Estas características son importantes, puesto que, se ha comprobado que el receptor Dectin-1, es capaz de discriminar entre polímeros solubles y particulados, permitiendo la unión de la molécula soluble, pero no siendo capaz de activar la vía de señalización; mientras que, el material particulado, son las responsables de poner en marcha la maquinaria enzimática [165].

Como estrategia alternativa del estudio del efecto inmunomodulador, en este trabajo se ha realizado un estudio comparativo del efecto de los EPSs y del LPS de *E. coli*, sobre el perfil de fosforilación de 48 quinasas humanas sintetizadas por los macrófagos M1 (fig. 11). Adicionalmente, aquellas proteínas diferencialmente expresadas entre tratamientos (con un factor de inducción $> 1,2$), se utilizaron para realizar un análisis funcional; para, así, integrar los resultados en rutas y vías moleculares, y relacionarlos con los procesos biológicos que las engloban (fig. 12, tabla 3, fig. 13, tabla 4, fig. 14 y tabla 5). El tratamiento con el LPS mostró la activación de 7 quinasas: c-Jun, ERK1/2, JNK, MSK1/2, AKT, HSP27 y p38; que se agruparon funcionalmente en la vía de señalización de la MAPK. Estos mediadores celulares están implicados en procesos de proliferación, diferenciación e inflamación como indican las vías de la ERK1/2 y la de JNK; pero, principalmente, dados los grandes niveles de expresión de la quinasa p38 fosforilada, están encaminados a procesos de apoptosis a través del efector MSK1/2 (fig. 15b). En consecuencia, los resultados obtenidos confirmaron el papel deletéreo, ya conocido, del LPS; desencadenando inflamación y muerte celular, como ya había mostrado el análisis funcional de términos GO (fig.13 y tabla 4).

El tratamiento con el EPS L, así como con el EPS P, provocó el incremento de 5 quinasas fosforiladas, diferentes a las activadas por el LPS: AKT, p70s6k, Fyn, Yes, CHK-2 y FAK. La AKT, aunque también se activó con el LPS (fosforilación en S473), su fosforilación se produjo en un aminoácido diferente (T308); lo que conlleva una

diferente fase de activación de la vía de señalización [166]. Asimismo, la p70s6k se detectó fosforilada en varias posiciones diferentes (T421/S242, T229); aunque para el análisis funcional sólo se consideró la proteína en sí y no sus distintas formas fosforiladas. El estudio molecular funcional de los efectos de los EPSs con el programa DAVID, mostró que estas quinasas se asociaban con diferentes rutas de señalización; pero sin relacionarse con la ruta de la MAPK (activada por el LPS). Una de las vías destacadas fue la de PI3K/AKT/mTOR (fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa-B/diana de rampamicina de mamíferos), en la que se encontraron los miembros la AKT y la p70s6k (fig. 15a). Esta vía es responsable de la activación de la proliferación, el metabolismo, la fagocitosis, la síntesis proteica y la supervivencia celular [167], de modo que demuestra el papel beneficioso del tratamiento de macrófagos con los EPSs. Pero además, recientemente, se le ha atribuido un papel anti-inflamatorio en la respuesta inmune innata a esta vía de la mTOR, a través de la supresión de la vía de la MAPK [168]. Dicha vía, está implicada en la señalización por los TLRs, y su activación, podría servir como un posible mecanismo de seguridad, que controlaría la respuesta celular contra patógenos y limitaría la producción de citoquinas pro-inflamatorias; aumentando la síntesis de aquellas anti-inflamatorias como la IL-10 [169].

Otra de las vías, que destacó el análisis funcional con DAVID, fue la de señalización de ErbB (fig. 15a), receptores que reconocen factores de crecimiento, y que regulan rutas de señalización intracelular de diversas respuestas biológicas como proliferación, diferenciación, movilidad celular y supervivencia. El tratamiento de macrófagos con los EPSs activó la ruta del PI3K/AKT/mTOR (con la AKT y la p70s6k) conllevando un aumento de la síntesis proteica, y a través de las proteínas Src a FAK (quinasa de adhesión focal), que incrementa la adhesión y migración celular.

Con el análisis funcional también se pudo integrar el resto de proteínas diferencialmente reguladas por los EPSs. Así, se encontró una vía de regulación de las uniones adherentes, en la que aparecieron representadas las proteínas Fyn y Yes (fig. 15a); indicando una regulación más en detalle de los mecanismos de proliferación celular de los macrófagos. Las uniones celulares adherentes, son el tipo

más común de adhesión intercelular; siendo importantes para el mantenimiento de la arquitectura tisular y la polaridad celular, y pudiendo, también, afectar al movimiento celular y proliferación. Las proteínas Fyn y Yes son reguladores de la β -catenina, produciendo la disociación del complejo con la cadherina, y causando la pérdida de adhesión celular necesaria para los mecanismos de migración y proliferación. Asimismo, estas quinasas juegan un papel importante en la activación de otras vías: regulando la actividad de los TLRs, de las integrinas y los receptores Fc γ (relacionados con la fagocitosis) [170].

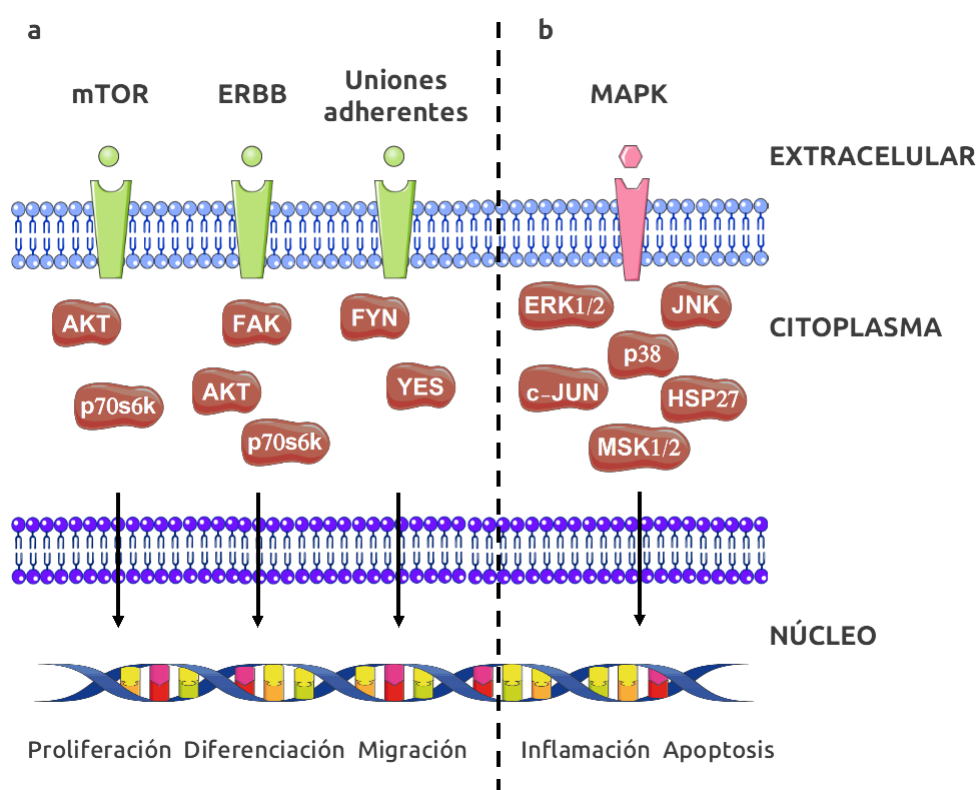


Figura 15. Vías de señalización activadas por los tratamientos de macrófagos M1 con los EPSs (a) o con el LPS (b). Adaptado del (KEGG) [124].

Considerando en conjunto los resultados obtenidos en modelos *in vitro* de inmunomodulación de macrófagos humanos, existe un efecto potencialmente anti-inflamatorio de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2 sintetizados por BAL, mediado por alteración de niveles de citoquinas. Además, la regulación diferencial de la fosforilación de quinasas, mostró un efecto regulador, que, posiblemente, favorezca procesos de proliferación y migración celular, así como de

supervivencia celular; activación de mecanismos que deberían estar favoreciendo la comunicación intercelular, y que, en el fondo, estarían demostrando la estimulación de la respuesta innata en los macrófagos.

CAPÍTULO 3

Efectos inmunomoduladores de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición *O*-2, en modelo *in vitro* de inflamación intestinal humana

1. INTRODUCCIÓN

El tracto intestinal humano presenta una estructura tisular única, con forma tubular sustentada por diversos tipos celulares localizados en diversas capas. Estructuralmente, el intestino está formado por un lumen interno recubierto completamente por un epitelio complejo, que posee en su región apical las denominadas microvellosidades intestinales, con el fin de aumentar la superficie de absorción de nutrientes y otros compuestos (como por ejemplo los fármacos) (fig. 1).

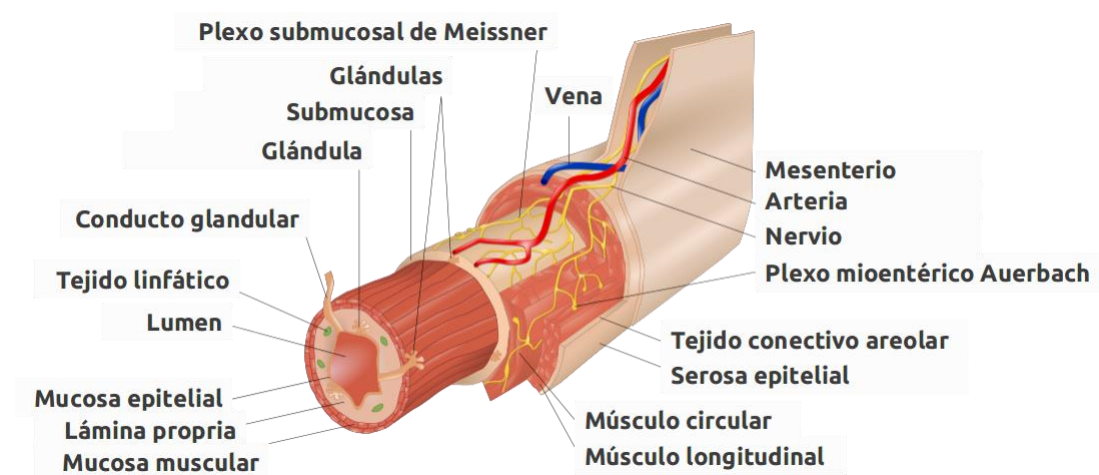


Figura 1. Estructura de la pared del tubo digestivo. Su interior se denomina lumen y la pared interna expuesta a al mismo, está constituida por la mucosa epitelial. En localización más externa aparecen la lámina propia, la mucosa muscular y la submucosa. Ambas mucosas contienen una capa de nervios entéricos que recorren los intestinos longitudinalmente, y se denomina: plexo submucosa; tras el cual se encuentra el plexo mioentérico, capa más externa de nervios entéricos, dispuesta entre dos capas de músculo liso. Además, las capas de submucosa presentan ramificaciones del sistema linfático en forma de ganglios entéricos. En todas estas capas existen vasos sanguíneos que en la región de las microvellosidades, forman un trama capilar responsable de la absorción de sustancias, para posteriormente ser incorporadas al torrente sanguíneo.

En cuanto a su composición celular, cada capa del intestino presenta una diversidad significativa (fig. 2). Si bien, el epitelio está formado mayoritariamente por los enterocitos, encargados de absorber y transportar los nutrientes, también existen otros 3 tipos celulares de naturaleza secretora: las células caliciformes, las células de Paneth y las células enterocrinas. Además, en las criptas de Lieberkühn, aparecen células madre intestinales responsables de la alta capacidad de regeneración del epitelio, que se renueva, aproximadamente, cada 7 días [171].

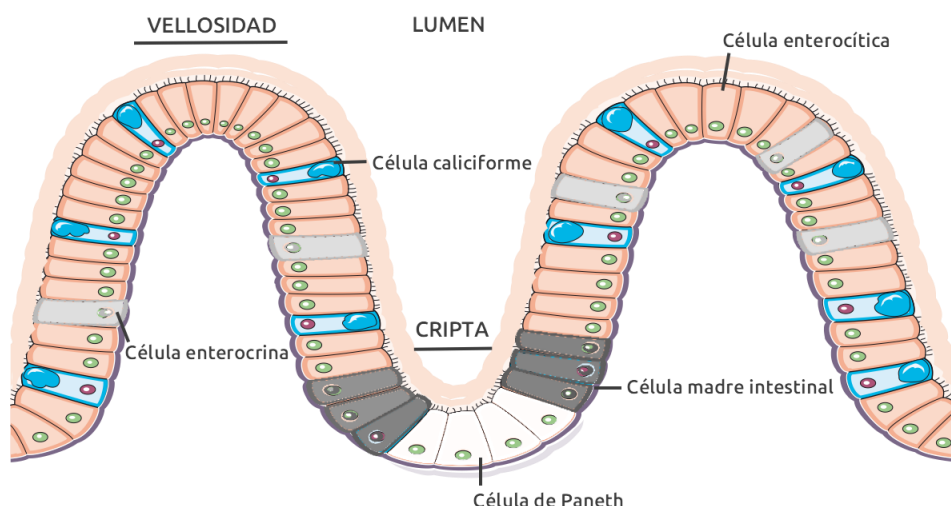


Figura 2. Epitelio intestinal y microvellosidades. El epitelio está formado mayoritariamente por enterocitos absorbentes, encargados de transportar macromoléculas, iones y agua; pero, también, existen otros tipos celulares secretores: las células caliciformes, que secretan mucinas en el lumen, formando una barrera protectora; las células de Paneth, que secretan péptidos antimicrobianos; y las células enterocrinas, que, entre otras funciones, secretan hormonas para regular la secreción de insulina, la saciedad y la liberación de enzimas digestivos desde el páncreas y/o la vesícula. En la base de las microvellosidades intestinales, también se encuentran acúmulos de células madre que regeneran el epitelio. Las células de la mucosa epitelial se encuentran polarizadas, mostrando características diferenciales entre la membrana apical (orientada hacia el lumen) y la membrana basolateral (orientada hacia la lámina propia).

Ya que el intestino es tan complejo, para el estudio del efecto de microorganismos, moléculas y compuestos, presentes en su lumen, se han desarrollado diversos modelos *in vitro* [172, 173]. Entre ellos, el más utilizado es el denominado de barrera, formado por una monocapa de células epiteliales intestinales (con características principalmente absorbentes); y que permite estudiar la permeabilidad y el paso de sustancias a través de dicha barrera. A pesar de que estos enterocitos humanos aislados, conservan características anatómicas y bioquímicas importantes durante su cultivo *in vitro*, su utilización presenta también grandes inconvenientes como: dificultad de cultivo, viabilidad limitada e imposibilidad de formar monocapas epiteliales polarizadas (no mostrando, en consecuencia, una superficie apical y otra basolateral). Por ello, normalmente, se emplean líneas carcinogénicas humanas como: la línea Caco-2, derivada de un carcinoma colorrectal (intestino grueso), que cuando se cultiva bajo condiciones específicas se diferencia y polariza como los enterocitos presentes en el intestino delgado [174] ; y la línea de células caliciformes HT-29 (así como su mutante HT-29 MTX) que produce constitutivamente mucina

[175]. Ambos tipos de líneas, han sido utilizadas para estudiar la capacidad de adhesión de BAL [67, 133] y Bifidobacterias [176, 177] productoras de EPSs.

Aunque, el modelo de barrera intestinal está aceptado como un buen modelo *in vitro* para predecir la permeabilidad al paso de sustancias, sólo refleja una parte aislada de la barrera epitelial; no pudiendo imitar las complejas interacciones del epitelio con otros tipos celulares integrados en el tejido *in vivo*, como las células caliciformes o las células del sistema inmunitario. Además, líneas como las células Caco-2, representan la mucosa normal, sin tener en cuenta los cambios fisiopatológicos que ocurren en condiciones de inflamación, estrés o daño tisular; por lo que no son adecuadas para el estudio de los efectos de medicamentos o coadyuvantes, durante procesos patológicos. Para cubrir estas carencias, surgieron los modelos de barrera intestinal con co-cultivo de células inmunocompetentes, que permiten aproximarse, más todavía, a la estructura y condiciones del intestino *in vivo* [173].

En los primeros estudios de mucosa intestinal inflamada, se emplearon líneas celulares epiteliales y cultivos de macrófagos y células dendríticas; cultivadas en insertos para imitar la compartimentalización lumen-lámina propia [178]. Pero, actualmente, se están utilizando las líneas celulares inmunes para sobrellevar los inconvenientes de dichos cultivos. Así, estudios de co-cultivo de las células Caco-2 y la línea celular de monocitos activados PMA-THP-1 (descrita en el capítulo 2), constituyen un modelo idóneo para estudiar la transducción de señal entre células epiteliales y macrófagos bajo la acción de diversos estímulos [179, 180] (fig. 3).

Se ha demostrado, que la presencia de los (1-3)- β -D-glucanos bacterianos, con ramificaciones O-2, incrementan la capacidad de adhesión de las BAL productoras a células epiteliales humanas Caco-2 [67]. Cabe resaltar, que el efecto beneficioso de este tipo de polisacáridos no es compartido por muchos de los EPSs bacterianos estudiados (tanto HoPs como HePs). De esta forma, la capacidad de adhesión *Lb. johnsonii* FI9785 a células del epitelio intestinal, disminuye cuando se reduce la producción de su HePs [181]. Asimismo, se ha demostrado que, para *Lactobacillus*

ramnosus GG, la presencia en su superficie de su EPS (rico en galactosas), disminuye su grado de adhesión [182].

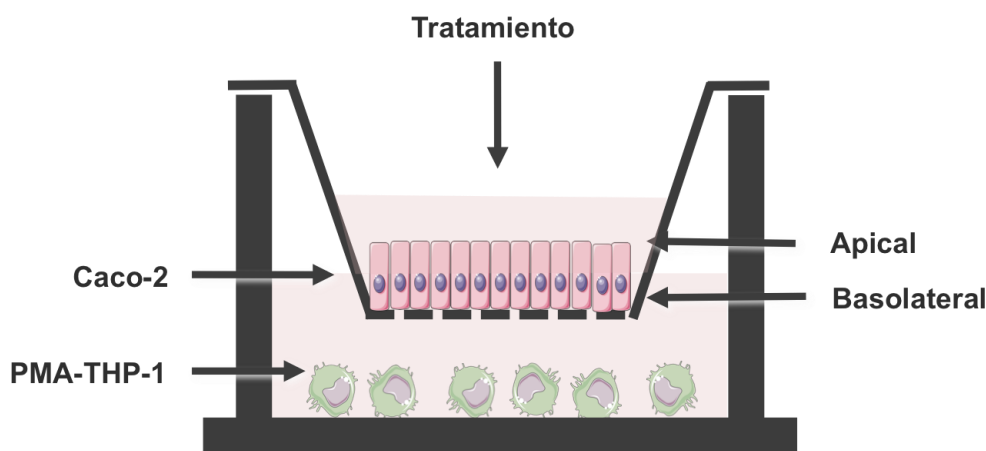


Figura 3. Modelo de mucosa intestinal *in vitro* a través de insertos. Este modelo permite evaluar los efectos del tratamiento sobre células epiteliales intestinales Caco-2, valorando la integridad de la monocapa y el paso de sustancias entre los compartimento superior e inferior; gracias a la membrana semipermeable del inserto. Además, en el compartimento inferior se pueden cultivar otros tipos celulares, pudiendo así establecerse modelos de co-cultivo más complejos y próximos a las condiciones fisiológicas; como un modelo de comunicación celular mucosa intestinal-sistema inmune, en presencia de macrófagos.

Por otra parte, los resultados descritos en el capítulo 2 de este trabajo de Tesis, y en Notararigo et al. (2014) [183], han revelado que los (1-3)- β -D-glucanos con ramificaciones *O*-2, sintetizados por BAL, son capaces de inmunomodular macrófagos humanos: (pro-inflamatorios M1) y procedentes de la línea celular THP-1 (estimulada con PMA).

En conjunto, estos resultados previos, indicaban que, los (1-3)- β -D-glucanos con ramificaciones *O*-2, podrían ser capaces de modular la respuesta inmune intestinal.

Con estos antecedentes, en este capítulo se establecieron y evaluaron distintas versiones del modelo *in vitro* de “transwell” (fig. 3), para investigar el efecto inmunomodulador de (1-3)- β -D-glucanos, con ramificaciones *O*-2 u *O*-6, debido a su interacción con la mucosa epitelial intestinal, y para estudiar los efectos de estos tratamientos sobre mecanismos celulares.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivos celulares

La línea celular Caco-2 se obtuvo del banco de células del CIB-CSIC. Se mantuvo en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% FBS (Sigma), 100 U mL⁻¹ penicilina (Gibco) y 100 µg mL⁻¹ estreptomicina (Gibco), en un incubador (37 °C, 5% CO₂).

Los protocolos referentes al cultivo de células monocitarias THP-1 y su activación con PMA, aparecen descritos en el apartado 2.2.1 de material y métodos del capítulo 2 del presente trabajo de Tesis.

2.2 Ensayo de citotoxicidad

Con el objeto de determinar si el tratamiento con los (1-3)-β-D-glucanos era tóxico para las células Caco-2 o afectaba a su capacidad de proliferación, se *utilizó el* kit del 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-tetrazolio-5-carboxanil (XTT) (Hoffman-La Roche); *sobre* dos modelos experimentales: células con elevada tasa de proliferación (monocapa en vía de diferenciación) y células con nula capacidad de proliferación (monocapa diferenciada y polarizada).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con medio DMEM completo: a una concentración de 9 x 10⁴ células en 100 µL por cada pocillo, en el caso de la monocapa en vía de diferenciación, y a una concentración de 2 x 10⁴ en 100 µL por cada pocillo, en el caso de la monocapa diferenciada. En el primer caso, los cultivos se incubaron 48 h (37 °C, 5% CO₂), mientras que en el segundo caso la incubación se prolongó durante 10 días. Transcurrido ese tiempo se realizó la determinación de la viabilidad celular relativa con el kit XTT, según el protocolo descrito en el apartado Materiales y métodos del capítulo 2 del presente trabajo de Tesis.

2.3 Co-cultivo celular y modelo *in vitro* de mucosa intestinal inflamada

Para establecer el modelo de mucosa intestinal inflamada, se utilizaron insertos (Corning) con membrana de policarbonato, y con poros de 0,4 µm de diámetro a una densidad de 1 x 10⁶ poros cm⁻². Estos insertos fueron, previamente, hidratados con 1,5 mL de medio en la parte superior de la cámara (inserto), y con 2,6 mL de medio

en la parte inferior de la cámara; manteniéndose durante al menos 2 h en un incubador (37 °C, 5% CO₂) antes de sembrar las células (según instrucciones del fabricante).

Las células Caco-2 se sembraron en los insertos con medio DMEM completo, a una concentración de 1×10^6 células mL⁻¹. El medio se renovó cada 48 h. Para monitorizar el estadio de diferenciación celular, se midió la resistencia de la monocapa cada dos días, con el voltímetro Millicell ERS-2 (Milipore), hasta que alcanzó un valor de, aproximadamente, 350-390 ohm (Ω). Para calcular el valor TEER (resistencia eléctrica transepitelial) de la monocapa, a este valor obtenido se le sustrajo el valor de un inserto sin células:

$$\text{TEER} = (R \text{ Muestra} - R \text{ Control}) \times \text{Área Inserto} = \Omega \times \text{cm}^2$$

Ecuación 1. Cálculo de la resistencia transepitelial.

Tres días antes de que el valor del TEER se aproximase a su óptimo, las THP-1 se diferenciaron a macrófagos con PMA, en placas de 6 pocillos y utilizando una concentración de 1×10^6 células mL⁻¹ en medio RPMI completo (siguiendo el protocolo previamente descrito en el apartado 2.2.2 del capítulo 2 de este trabajo).

El modelo *in vitro* de mucosa intestinal, inflamada o no inflamada, se estableció cuando ambas líneas estuvieron listas para iniciar los experimentos; momento en el que, los insertos de las Caco-2, se depositaron sobre la placa en la que se habían cultivado las células PMA-THP-1. Para este modelo, se utilizó el medio DMEM, sin suplementar o suplementado independientemente con cada uno de los (1-3)- β -D-glucanos, y/o con el LPS de *E. coli* serotipo 026:B6. Después de los tiempos de incubación indicados en la sección de Resultados de este capítulo, se recuperaron los sobrenadantes, independientemente de cada uno de los compartimentos, por centrifugación a $300 \times g$, en una centrífuga 5810R (Eppendorf); se alicuotaron y se congelaron a -80 °C para su posterior análisis.

Al mismo tiempo, tras eliminar el sobrenadante y, para una posterior extracción del RNA total, se añadió Trizol (Ambion) a ambos tipos celulares y se congelaron a -80°C .

2.3.1. Tratamientos experimentales

Las moléculas evaluadas en el modelo de mucosa intestinal fueron tres (1-3)- β -D-glucanos: el EPS L, el EPS P (ambos producidos, aislados y purificados de BAL como se ha descrito en los apartados 2.2 y 2.3 del capítulo 1 de este trabajo de Tesis), o la laminarina (Sigma); a una concentración de $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Los experimentos se realizaron en presencia o en ausencia del LPS de *E. coli* serotipo 026:B6, a una concentración de 10 ng mL^{-1} . Las condiciones del tratamiento se indican en el apartado correspondiente de la sección de Resultados de este capítulo.

2.4 Determinación de los niveles de citoquinas

Los sobrenadantes de los cultivos celulares, se utilizaron para cuantificar los niveles de las citoquinas: pro-inflamatorias (TNF- α e IL-8), y anti-inflamatorias (IL-10). Para el TNF- α y la IL-10 se utilizó el kit OptEIA (BD) (ya descrito en el capítulo 2, apartado 2.4.1 del presente trabajo de Tesis), mientras que para la IL-8 se utilizó el kit DuoSet ELISA (RD Systems), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Brevemente, se diluyó el anticuerpo a la concentración de trabajo de $4\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ en PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de Na_2HPO_4 , 1,5 mM de KH_2PO_4 , pH 7,2-7,4, filtrado por membrana de $0,2\text{ }\mu\text{m}$) y se recubrieron los 96 pocillos de cada placa con $100\text{ }\mu\text{L}$ del tampón PBS; se sellaron las tapas de las placas y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente, para conseguir que el anticuerpo se adhiriera a los pocillos. Al día siguiente, se aspiró el anticuerpo no unido y se lavó cada pocillo 3 veces con $400\text{ }\mu\text{L}$ de solución de lavado (Tween 20 al 0,05 %, en PBS, pH 7,2-7,4), para limpiar y eliminar cualquier resto. Después del último lavado, se secó la placa por inversión y contra un papel limpio. Posteriormente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos, añadiendo, a cada pocillo, $300\text{ }\mu\text{L}$ de solución de bloqueo (1% de BSA -Sigma- disuelto en PBS, pH 7,2-7,4, filtrado por membrana de $0,2\text{ }\mu\text{m}$) e incubando a temperatura ambiente durante al menos 1 h. Esta operación se repitió, junto con sus lavados correspondientes, 3 veces.

Seguidamente, se procedió a realizar la unión antígeno-anticuerpo, añadiendo, a cada pocillo, 100 μL de la muestra (sobrenadante de cultivo celular) o de la citoquina patrón diluida en el reactivo de dilución (0,1 % de BSA, 0,05 % de Tween 20 en Tris-buffer salino -Trizma base 20 mM, NaCl 150 mM-, pH 7,2-7,4, y filtrado por membrana de 0,2 μm), e incubando durante 2 h a temperatura ambiente. (El estándar molecular utilizado fue una IL-8 recombinante humana, a una concentración de 100 ng mL⁻¹, reconstituida en 0,5 mL de agua desionizada.) Tras la incubación de la placa, se aspiraron las soluciones presentes en los pocillos y se lavaron, estos, 3 veces con la solución de lavado. Para la detección de la IL-8, se añadieron, a cada pocillo, 100 μL del anticuerpo de detección combinado con biotina, a una concentración final de 20 ng mL⁻¹ (disuelta en el reactivo de dilución), y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se aspiró el anticuerpo sobrante y se repitieron los 3 ciclos de lavados previamente descritos. Después, se añadieron 100 μL de estreptavidina en cada pocillo (a la dilución especificada en cada vial por la casa comercial) y las placas se incubaron 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las muestras en cada pocillo, se sometieron a 3 ciclos de aspiración y lavado. Finalmente, para llevar a cabo la reacción colorimétrica que permite realizar la cuantificación de la citoquina, se añadieron a cada pocillo 100 μL de la solución del sustrato (mezcla 1:1 de reactivo A y reactivo B) y las placas se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y evitando la luz directa. La reacción se bloqueó añadiendo 50 μL de solución de parada (H_2SO_4 2N) a cada pocillo, y se midió la Abs a 450 nm en lector de placas 680 (Bio-Rad).

Para el cálculo de los resultados, se construyó una curva estándar enfrentando los valores de Abs obtenidos, frente a las concentraciones de los estándares; y se estableció una recta de regresión que se ajustó a los datos, y con la ecuación de la recta se extrapolaron las concentraciones de la IL-8 presente en las muestras.

2.5 Extracción y análisis del RNA total

Una vez finalizados los tratamientos experimentales, y tras retirar los sobrenadantes, se añadieron 600 μ L de Trizol (Ambion) a las células Caco-2, y 1 mL a las células PMA-THP-1; manteniendo las células en todo momento a 4 °C en hielo, empleando materiales y ambiente libre de RNasas, y siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para la extracción del RNA total, brevemente, se incubaron las células durante 5 min a temperatura ambiente y se disgregaron mecánicamente a través de puntas de micropipeta de 1000 μ L. Después, se añadieron 0,2 mL de cloroformo (Sigma) por cada mL de Trizol, se agitaron con vórtex durante 15 s y los extractos se incubaron durante 2-3 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se centrifugaron durante 15 min a 12.000 $\times g$ y a 4 °C en una centrífuga 5415R (Eppendorf). Para precipitar el RNA, se transfirió la fase acuosa a otro microtubo, al que se añadió 500 μ L de isopropanol al 100 % (Sigma), por cada mL de Trizol utilizado. Las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min y, después de una centrifugación durante 10 min a 12.000 $\times g$ y 4°C, se eliminaron los sobrenadantes y a los precipitados se les adicionó 1 mL de etanol al 75% ,por cada mL de Trizol utilizado. Las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron durante 5 min a 7.500 $\times g$ y a 4°C. Tras eliminar los sobrenadantes, los RNAs sedimentados se secaron a temperatura ambiente durante 5-10 min, bajo vacío.

Cada preparación de RNA total se resuspendió en 25 μ L de agua ultrapura libre de DNasas/RNasas; y se almacenó en un congelador a -80°C.

Una vez obtenido el RNA total, se evaluó su concentración e integridad en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), empleando los kits RNA 6000 Nano Chip; aceptando solo aquellas muestras en las que los RNAs ribosomales 28 S y 18 S estaban en una proporción $> 1,5$, y en las que el número de integridad del RNA (RIN) era superior a 6 (según las instrucciones del fabricante) [184].

El equipo Bioanalyzer 2100, y sus kits, consisten en una herramienta de “*lab-on-chip*” que permite el análisis rápido de ácidos nucleicos, gracias a la integración de diferentes pasos experimentales. Brevemente, el “*chip*” contiene pocillos para las

muestras, para el gel y para un control externo. Los microcanales están fabricados en vidrio para crear una red interconectada entre los pocillos. Durante la preparación del “chip”, los microcanales se llenaron con un polímero y un colorante fluorescente; para, después, depositar, en sus respectivos pocillos, las muestras y el patrón de masa molecular, integrando el “chip” en un circuito eléctrico con el Bioanalyzer 2100, encajando los electrodos del soporte con los pocillos del chip. Dada la carga del RNA y la matriz electroforética, las muestras se separaron por tamaño; al tiempo que el colorante se intercaló entre las cadenas de RNA, lo que permitió la detección de estos complejos por fluorescencia inducida por láser.

Los datos obtenidos en cada carrera se integraron como bandas de geles y como picos de electroferogramas. El patrón utilizado como referencia en cada análisis y proporcionado por el fabricante (RNA 6000 ladder standard), consta de 6 RNAs de tamaño entre 0,2-6 kb, a una concentración total de 150 ng μl^{-1} . El software del equipo automáticamente comparó las muestras con los fragmentos del patrón para determinar la concentración de las mismas, y para identificar los picos de RNA ribosomal.

2.6 Síntesis de cDNA a partir de preparaciones de RNA total

Para la síntesis de cDNA, a partir de RNA, se empleó el kit “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription*” (Applied Biosystems), utilizando el protocolo recomendado por el suministrador.

Se prepararon mezclas en microtubos para análisis de PCR, conteniendo cada una de ellas: 25 μL de la 2X RT master mix (conteniendo la transcriptasa reversa MultiScribe, así como los ribonucleótidos y el tampón requerido para la síntesis del cDNA por la enzima) y 25 μL de una solución acuosa, conteniendo 2 μg de RNA total. Las muestras se introdujeron en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) y el cDNA se sintetizó con un programa: 10 min a 25 °C, 2 h a 37 °C y 5 min a 85 °C. Al finalizar la reacción, se añadieron 50 μL de agua libre de RNasas a cada tubo, y se almacenaron a -20 °C.

2.7 Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa

Los niveles de expresión génica se determinaron empleando PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), mediante sondas TaqMan (Applied Biosystems), empleando el kit *“TaqMan Fast Universal PCR Master Mix”* (2X) (Applied Biosystems) y el equipo 7500 Fast Real time PCR System (Applied Biosystems). Se analizó la expresión de los genes que codifican las interleuquinas IL-8, IL-10 y TSLP (linfopoyetina estromal del timo), empleando sondas de *“Assay-on-demand”*, y siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. (Todos los pasos se realizaron en frío, en un entorno y con materiales libres de RNasas.) El uso de sondas fluorescentes Taqman, permite que al sintetizar la DNA polimerasa el DNA, las sondas hibridadas con la cadena molde sean hidrolizadas debido a la actividad 5' exonucleasa de la enzima, y se produzca la liberación de las mismas con el consiguiente aumento de fluorescencia en cada ciclo de PCR (proporcional a la cantidad de sonda hidrolizada, y por tanto, a la cantidad de mRNA del gen analizado).

Brevemente, se realizaron los ensayos por triplicado y la placa de PCR de 96 pocillos contenía: el ensayo de expresión génica TaqMan (para cada muestra de cDNA), un gen control de la expresión génica endógena o constitutiva (la ciclofilina A, PPIA) y un control negativo sin cDNA (para valorar posibles contaminaciones por ácidos nucleicos). Se preparó la mezcla necesaria para cada gen (problema y control): 10 µl de MasterMix, 1 µl de sonda TaqMan y 4 µl de agua, por cada reacción. Para cada reacción se añadieron 15 µl de esta mezcla y 5 µl del cDNA (previamente sintetizado), y se selló la placa. Seguidamente, se llevaron a cabo las reacciones con el siguiente programa: 1 ciclo a 95 °C durante 20 s, 30 ciclos a 95 °C durante 3 s y un ciclo final a 60 °C durante 30 s.

Los resultados de la qPCR se analizaron con el software Data Assist (Applied Biosystems), atendiendo al gráfico conjunto de amplificación de los genes en la placa, estableciendo el valor de la línea base y de los valores umbral, y finalizando con el análisis de los resultados empleando el método comparativo del ciclo umbral (Ct): $2^{\Delta Ct}$. Dicho método se basa en la comparación de los valores Ct de las muestras

tratadas con el del control no tratado (normalizados frente al gen endógeno de expresión constitutiva).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Tratado} - \Delta Ct \text{ Control}$$

Ecuación 2. Cálculo del $\Delta\Delta Ct$.

2.8 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, EE.UU.).

Brevemente, los datos fueron sometidos al test de normalidad de Kolmogorov y Smirnow. La significación para valores paramétricos pareados, se obtuvo con el test ANOVA ,y posteriormente con el test Dunnett; mientras que para valores no paramétricos pareados, se realizó el test ANOVA Friedman ,y posteriormente el test Dunns.

El análisis estadístico de los experimentos de co-cultivo fue realizado siguiendo el mismo protocolo de test ANOVA para datos pareados:

- **Tratamiento *versus* controles no tratados:** para valorar los posibles efectos de los EPSs en un estado basal o de inflamación de las células. Los valores significativos se representaron como p*.
- **Tratamiento *versus* control de inflamación:** para valorar los posibles efectos moduladores de la inflamación mediados por los EPSs. Los valores significativos se representaron como p[😊].

3. RESULTADOS

3.1 Efectos de los (1-3)- β -D-glucanos sobre la viabilidad de las células Caco-2

Antes de proceder a establecer un modelo de inserto “*transwell*”, se evaluó el posible efecto tóxico de los EPSs y de la laminarina, sobre la viabilidad de las células Caco-2. Ya que la laminarina es un inmunoestimulante y, al igual que los EPSs, es un (1-3)- β -D-glucano, pero con ramificaciones en posición *O*-6, también se evaluó su

efecto en este experimento, y en otros posteriores. Los resultados obtenidos, revelaron que ninguno de los tratamientos afectaba al metabolismo celular de las células Caco-2, tanto, durante su estadio de diferenciación (alta tasa de proliferación, fig. 4a), como cuando la monocapa ya estaba diferenciada y polarizada (etapa no proliferativa, fig. 4b).

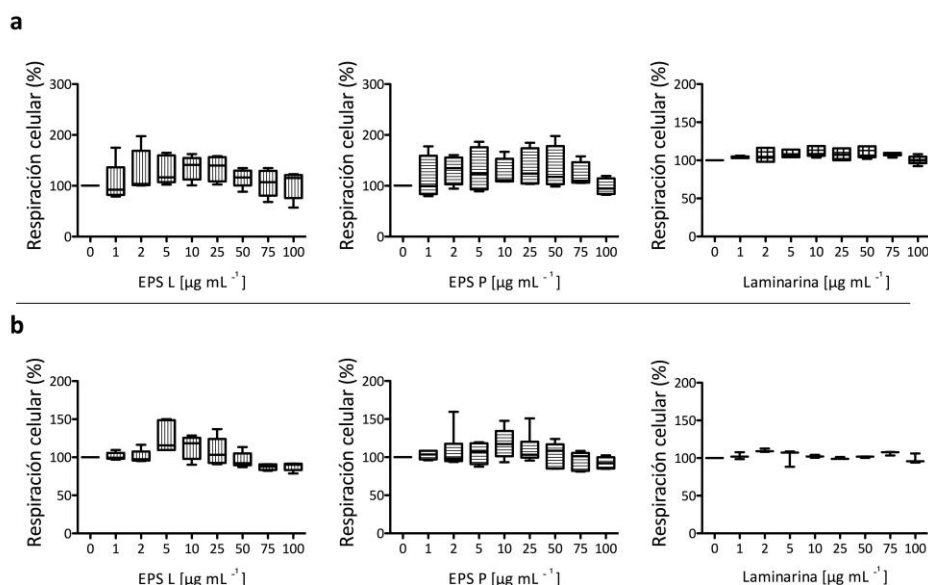


Figura 4. Análisis de la influencia del tratamiento con los (1-3)-β-D-glucanos sobre la viabilidad de las células Caco-2. a) Monocapa de mucosa epitelial en diferenciación, b) monocapa diferenciada. El método del XTT permitió valorar el efecto de los polímeros a diferentes concentraciones sobre la respiración celular, utilizando como el 100 % el valor del control no tratado.

Además, cabe resaltar, que cuando la monocapa estaba en fase de diferenciación, se observó una ligera tendencia de aumento de la tasa de respiración celular con los tratamientos; hecho que no se detectó cuando la monocapa de mucosa epitelial estaba diferenciada. Así, estos resultados confirmaron que los EPSs, y la laminarina, no son tóxicos para los cultivos de células Caco-2, en ninguna de las fases analizadas.

3.2 Establecimiento de un modelo *in vitro* de inflamación intestinal con co-cultivo de enterocitos Caco-2 y macrófagos PMA-THP-1

Para establecer un modelo de inflamación intestinal *in vitro*, se empleó un “transwell”, conteniendo en el inserto superior células Caco-2 y en el compartimento inferior macrófagos PMA-THP-1.

El uso de los insertos “*transwell*”, para el cultivo de las células Caco-2, permitió obtener enterocitos que se asemejaban a los que existen *in vivo*: células diferenciadas que constituyen una monocapa de células polarizadas, presentando microvellosidades en su parte apical y el dominio basolateral (ver fig. 3); reproduciendo, así, un modelo de epitelio intestinal, cuya región basal representaría a la lámina propia, que estaría en contacto con el sistema inmune intestinal. Estas características morfológicas (confluencia y formación de monocapa con uniones intercelulares fuertes) fueron valoradas a través de microscopía óptica, verificando la diferenciación del epitelio (resultados no mostrados), y a través del valor TEER. En este estudio se utilizó como indicador del momento óptimo para realizar los experimentos valores del TEER en el rango de 950-1000 Ω por cm^2 .

Para comprobar la funcionalidad del modelo de co-cultivo *in vitro*, se determinó, en primer lugar, la influencia de la adición del LPS de *E. coli* en el compartimento inferior, sobre los niveles de las citoquinas: TNF- α y IL-8 (pro-inflamatorias) e IL-10 (anti-inflamatoria) -tanto en compartimento superior como en el inferior- (fig. 5). La evaluación se realizó en la fase inicial o aguda de inflamación, con un tratamiento de 6 h (fig. 5 I), y en la fase tardía o de resolución, con un tratamiento de 24 h (fig. 5 II). Solamente se detectó, como excepción, que los niveles de la IL-8 en el compartimento inferior y a las 24 h de tratamiento, fueron elevados (aproximadamente 2000 pg mL^{-1}), tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas con el LPS (fig. 5 IIb). Para el resto de las determinaciones ambos tratamientos con el LPS conllevaron un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de las citoquinas analizadas, tanto en el compartimento que contenía las células Caco-2 (fig. 5a), como en el que se encontraban los macrófagos PMA-THP-1 (fig. 5b). A las 6 h de incubación, esta inducción fue muy drástica para la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en el compartimento inferior (niveles aproximadamente 240 veces superiores a los observados en el control no tratado, fig. 5 Ib), y se mantuvo, incluso con un incremento creciente, después de 24 h de tratamiento (fig. 5 IIb). Este patrón de activación se observó también para la IL-10, mientras que para la IL-8, sólo se detectó una activación significativa a las 6 h (fig. 5 Ib). Sin embargo, en el compartimento superior, se detectó un incremento, de aproximadamente 2 veces,

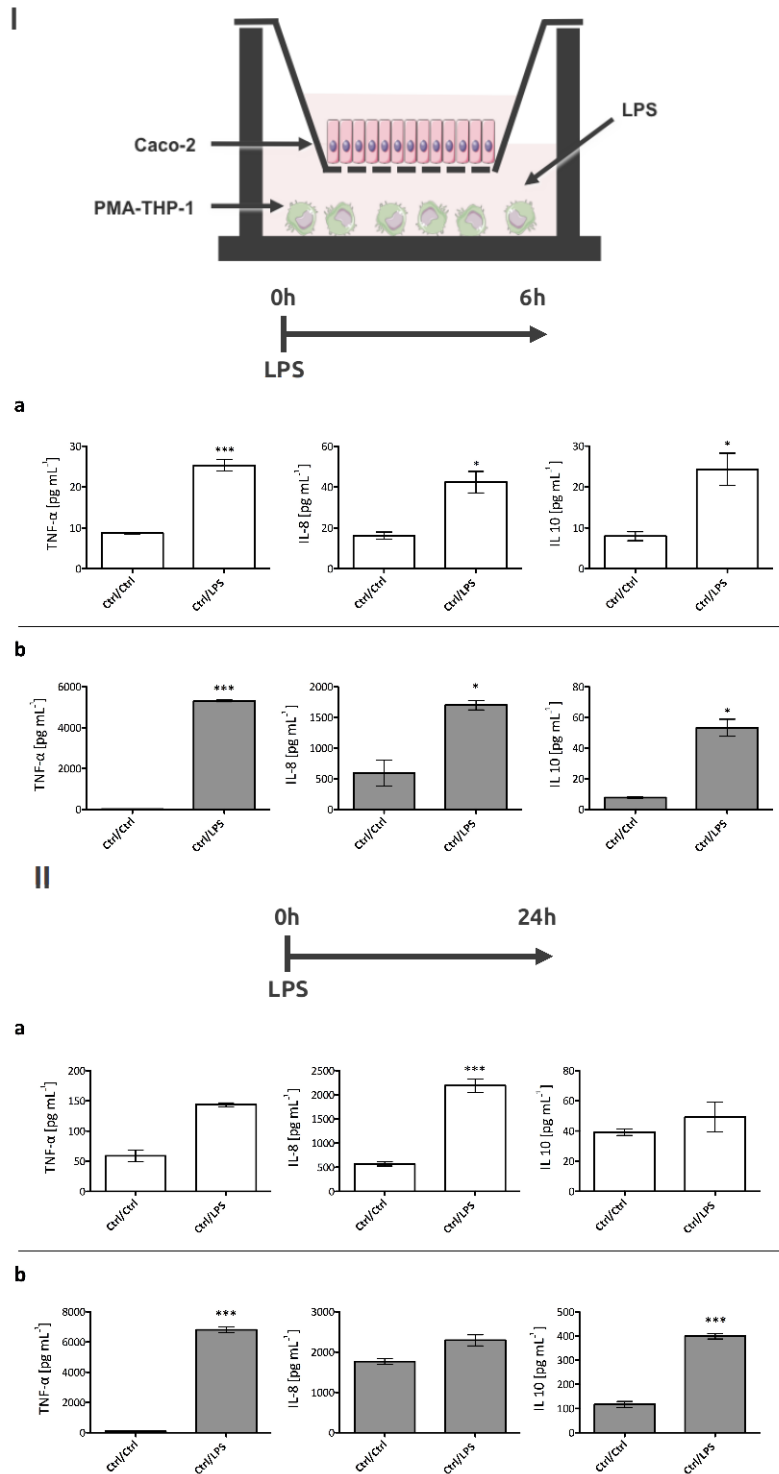


Figura 5. Efectos del tratamiento con el LPS durante 6 h (I) y 24 h (II) sobre la producción de citoquinas en el modelo de co-cultivo en el compartimento superior (a) y en el compartimento inferior (b). En la parte superior se representa el modelo *in vitro* de mucosa intestinal humana inflamada. Cuando la monocapa epitelial estuvo establecida, se realizó la estimulación de la inflamación en modelo por la adición de LPS a los macrófagos PMA-THP-1. Se cuantificaron las citoquinas TNF-α e IL-8 (pro-inflamatorias) y la IL-10 (anti-inflamatoria) secretadas por las células del modelo, en respuesta al tratamiento con LPS. Se analizaron los niveles de citoquinas en los compartimentos por separado, para valorar el efecto del tratamiento de manera individualizada. *Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado).

para las 3 citoquinas a las 6 h de tratamiento (fig. 5 Ib), siendo despreciable a las 24 h para la IL-10, y de 3 y 4 veces para el TNF- α y la IL-8, respectivamente (fig. 5 IIb).

Estos resultados indicaban el establecimiento de una respuesta inflamatoria rápida, a nivel de las células PMA-THP-1, en este modelo estimulado de mucosa intestinal *in vitro*. Además, parecía mostrar un efecto de transducción de señal de las células estimuladas LPS-PM1-THP-1 a las células Caco-2. Sin embargo, este efecto también podría ser debido a una estimulación directa del LPS sobre la región basolateral de las células Caco-2. Así, para discriminar entre estas dos posibilidades, se realizó el mismo tipo de experimento que el descrito previamente (fig. 5), pero en ausencia de los macrófagos PMA-THP-1 (fig. 6); y nuevamente se cuantificaron los niveles de las 3 citoquinas en los dos compartimentos.

El análisis de los niveles de las citoquinas después de 6 h de tratamiento con el LPS, no reveló niveles detectables para ninguna de las 3 citoquinas, tanto en los “*transwell*” tratados, como en los sin tratar (resultados no mostrados). Además, después de 24 h de incubación, el tratamiento con LPS no provocó un incremento de la IL-8. También, los niveles de la citoquina en presencia del LPS fueron, en ambos compartimentos, muy inferiores (3 pg mL⁻¹ (fig. 6a) y 70 pg mL⁻¹ (fig. 6b)) a los detectados previamente, cuando las células PMA-THP1 fueron estimuladas (figs. 5a y 5b, aproximadamente 2.000 pg mL⁻¹). En consecuencia, los resultados obtenidos revelaron la existencia de una influencia del LPS sobre las células Caco-2 mediada por su interacción con los macrófagos (LPS-PMA-THP-1) en el modelo de “*transwell*” (fig. 5b).

Por otra parte, las células Caco-2 polarizadas, también poseen algunos receptores TL-4 en su borde apical [185]. Por este motivo, también quiso evaluarse un modelo de “*transwell*” potencialmente inflamatorio, por estimulación directa con el LPS de las células Caco-2 localizadas en el inserto, en presencia de las células PMA-THP-1 en el compartimento inferior (fig. 7); y determinar su efecto a nivel de producción de citoquinas en ambos compartimentos. Como puede observarse en la figura 7, este

tratamiento no provocó ninguna alteración significativa en los niveles de producción de citoquinas de las células Caco-2, ni de las células PMA-THP-1.

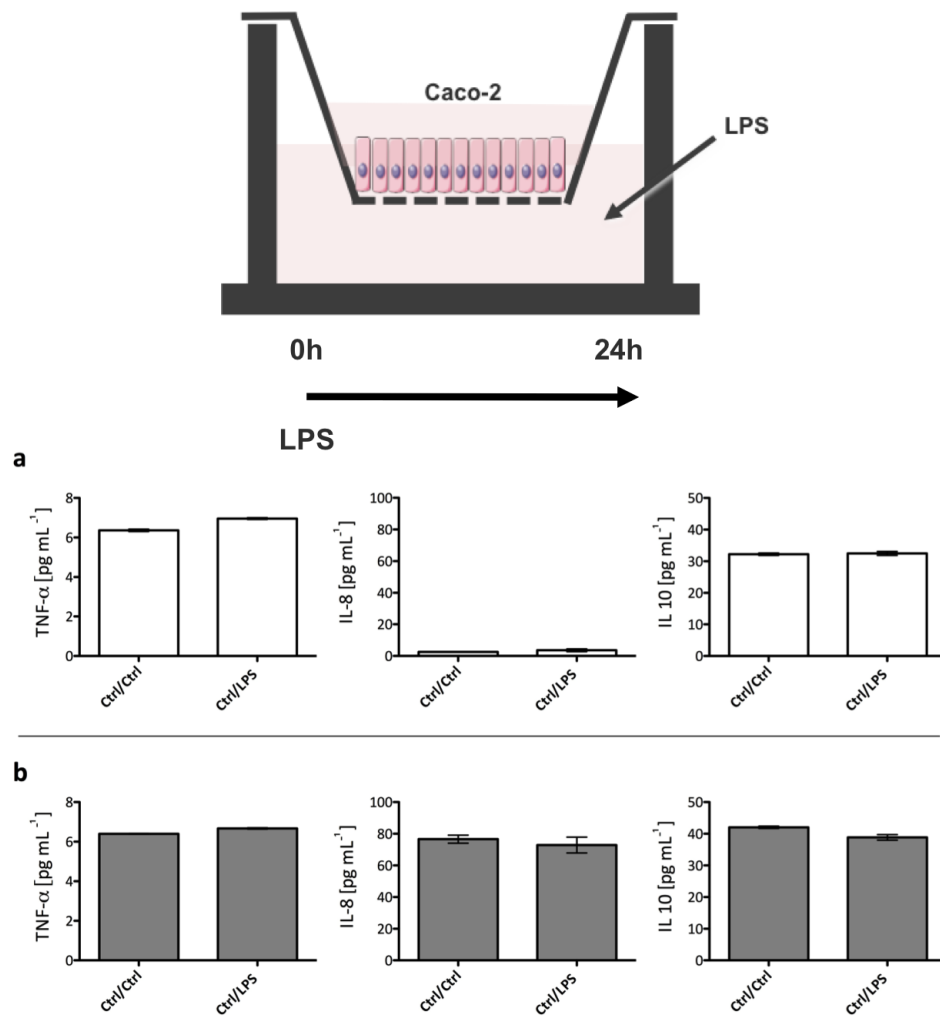


Figura 6. Efectos de la estimulación de las células epiteliales con el LPS en el compartimento superior (a) y en el compartimento inferior (b). En la parte superior se esquematiza el experimento, en el que se añadió el LPS en el compartimento inferior, en ausencia de macrófagos PMA-THP-1, para comprobar si era capaz de activar las células Caco-2 presentes en el inserto superior, a través de la membrana basolateral (que debería contener receptores específicos). Se analizaron los niveles de citoquinas (TNF-α, IL-10 e IL-8) secretadas por las células Caco-2 (en cada compartimento) en respuesta al tratamiento con el LPS.

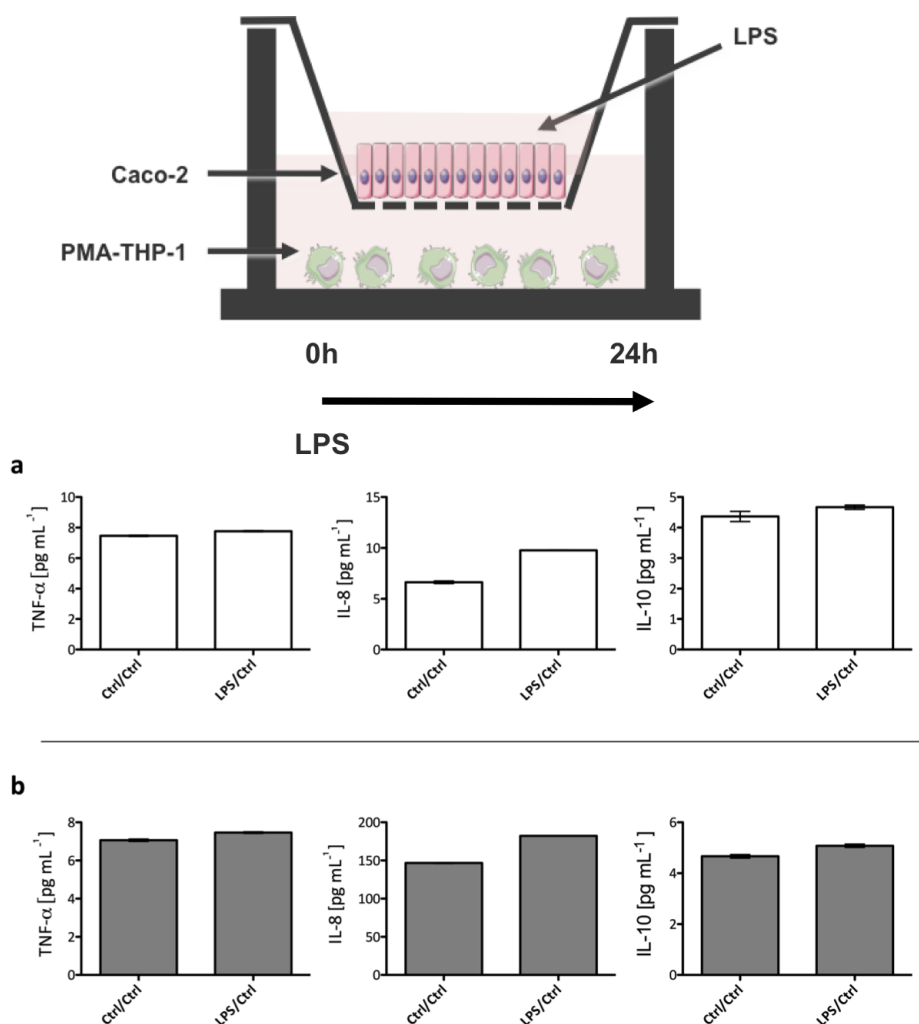


Figura 7. Efectos del tratamiento de las células Caco-2 con el LPS en el modelo de co-cultivo en el compartimento superior (a) y en el compartimento inferior (b). Parte superior, representación esquemática de la estimulación de las células epiteliales con el LPS en modelo de “transwell”. Se cuantificaron los niveles de las citoquinas secretadas (TNF- α , IL-8 e IL-10) por las células Caco-2 y PMA-THP-1 en sus respectivos compartimentos. No se observaron cambios en la secreción de las citoquinas tras el tratamiento con el LPS y, por tanto, se excluyó una comunicación intercelular entre Caco-2 y PMA-THP-1.

En consecuencia, se adoptó el modelo de “transwell” inflamatorio, mostrado en la figura 5, para realizar los estudios subsiguientes.

3.3 Inmounomodulación de las células Caco-2 y PMA-THP-1 por los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en modelo *in vitro* de inflamación intestinal

Una vez establecido el modelo *in vitro* de mucosa intestinal humana inflamada, en el cual, gracias al co-cultivo de células Caco-2 y células PMA-THP-1, se produce la interacción de células epiteliales y células inmunitarias; se procedió a estudiar el

efecto que el tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos pudiera tener en los niveles de inflamación.

Con este fin, se analizó un co-tratamiento simultáneo de los macrófagos con el LPS y de los enterocitos con EPS L, EPS P o laminarina, tanto durante 6 h (fig. 8), como durante 24 h (fig. 9).

Los resultados obtenidos, después de 6 h de tratamiento, mostraron que el incremento de producción de las citoquinas TNF- α e IL-10 por las células Caco-2, mediado por la interacción LPS-PMA-THP-1, era parcial y significativamente ($p < 0,05$) contrarrestado por el tratamiento con cada uno de los tres (1-3)- β -D-glucanos (fig. 8a). Además, en presencia de los polisacáridos, los niveles de la IL-8 producidos por los enterocitos, fueron significativamente superiores a los detectados en el control no tratado ($p < 0,05$) (fig. 8a).

Respecto a los macrófagos PMA-THP-1, sólo la laminarina contrarrestó parcial y significativamente ($p < 0,05$) la inducción de la secreción de la IL-8 provocada por el LPS (fig. 8b). Además, se comprobó que el co-tratamiento con el LPS y el EPS P o el EPS L, potenciaba la inducción de la producción de la IL-10 por los macrófagos (fig. 8b), efecto también observado en ausencia del LPS (resultados no mostrados).

Globalmente, los resultados del modelo *in vitro* de mucosa intestinal inflamada, demostraron un efecto anti-inflamatorio del co-tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos durante 6 h, reflejado en un discreto descenso de los marcadores inflamatorios (TNF- α e IL-8) y un aumento del marcador anti-inflamatorio (la IL-10) en las células PMA-THP-1; indicando una transducción de señal de la interacción polisacárido-Caco-2 a los macrófagos. Cuando las células se sometieron a tratamiento durante 24 h, en el caso de la línea Caco-2, el co-tratamiento con los polisacáridos (fig. 9a) no provocó una reducción del efecto inductor del LPS-PMA-THP-1, como se había observado previamente en las células tratadas durante 6 h (fig. 8a). Además, en las células epiteliales sólo se detectó un efecto significativo del EPS L, pero, tan sólo, parcialmente inhibitorio de la estimulación provocada por el LPS sobre los niveles de producción de IL-8 (fig. 9a). Sin embargo, sí se observó, para las Caco-2, un incremento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de la IL-10 en los co-

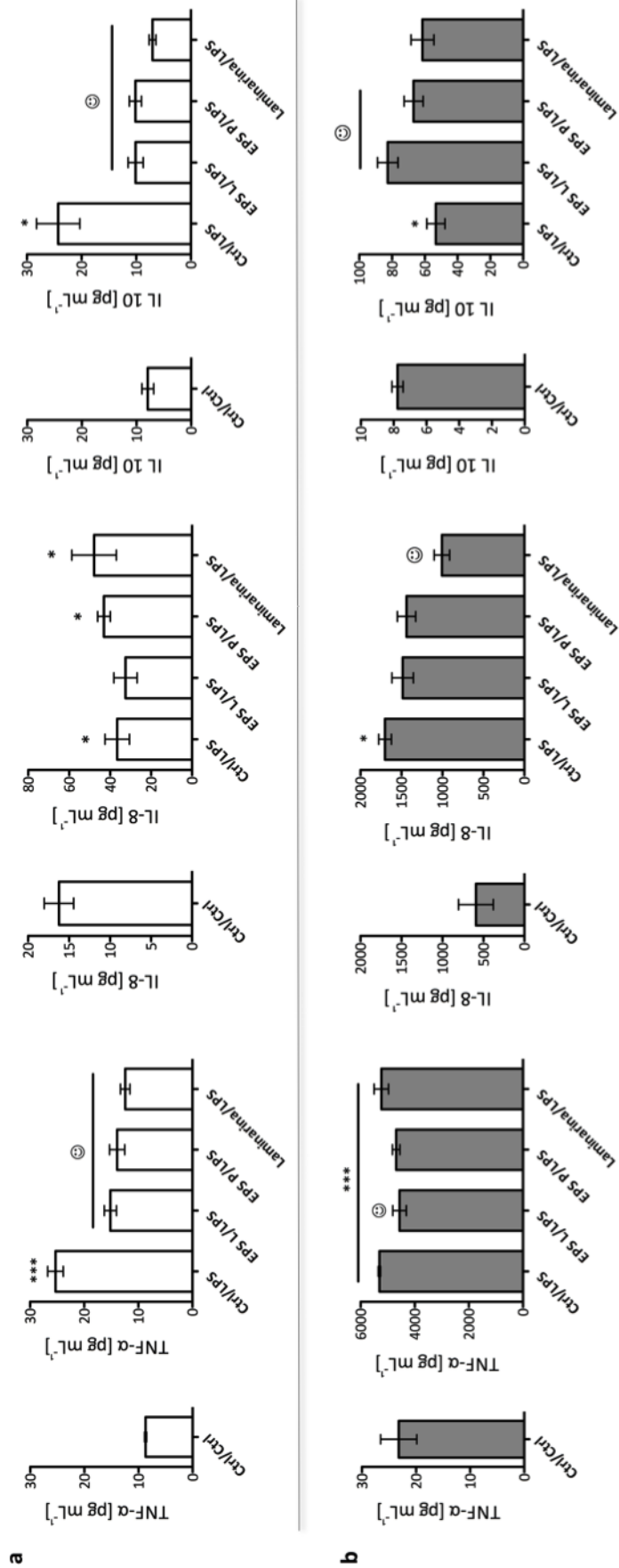


Figura 8. Efecto de los tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos durante 6 h en el modelo *in vitro* de mucosa intestinal inflamada en el compartimento superior (a) y en el compartimento inferior (b). Se cuantificaron los niveles de las citoquinas secretadas (TNF-α, IL-8 e IL-10) por las células Caco-2 y PMA-THP-1 en sus respectivos compartimentos, tras el tratamiento con los EPSs y el LPS, respectivamente. En cuanto al TNF-α, en el compartimento de las células Caco-2, los niveles de las muestras estimuladas sólo con el LPS, fueron significativamente mayores respecto a las no estimuladas. En el compartimento de los macrófagos PMA-THP-1, tanto el estímulo con LPS como el co-tratamiento indujeron una elevada síntesis de la citoquina. Para la IL-8, la incubación de las células PMA-THP-1 con el LPS se tradujo en una mayor secreción de esta citoquina en ambos compartimentos, significativamente superiores a los detectados en las muestras no tratadas. Respecto a la IL-10, el estímulo con el LPS provocó también en ambos compartimentos un incremento significativo de los niveles de la misma respecto al control no estimulado. * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado); ☺ $p < 0,05$ (respecto al control estimulado con el LPS).

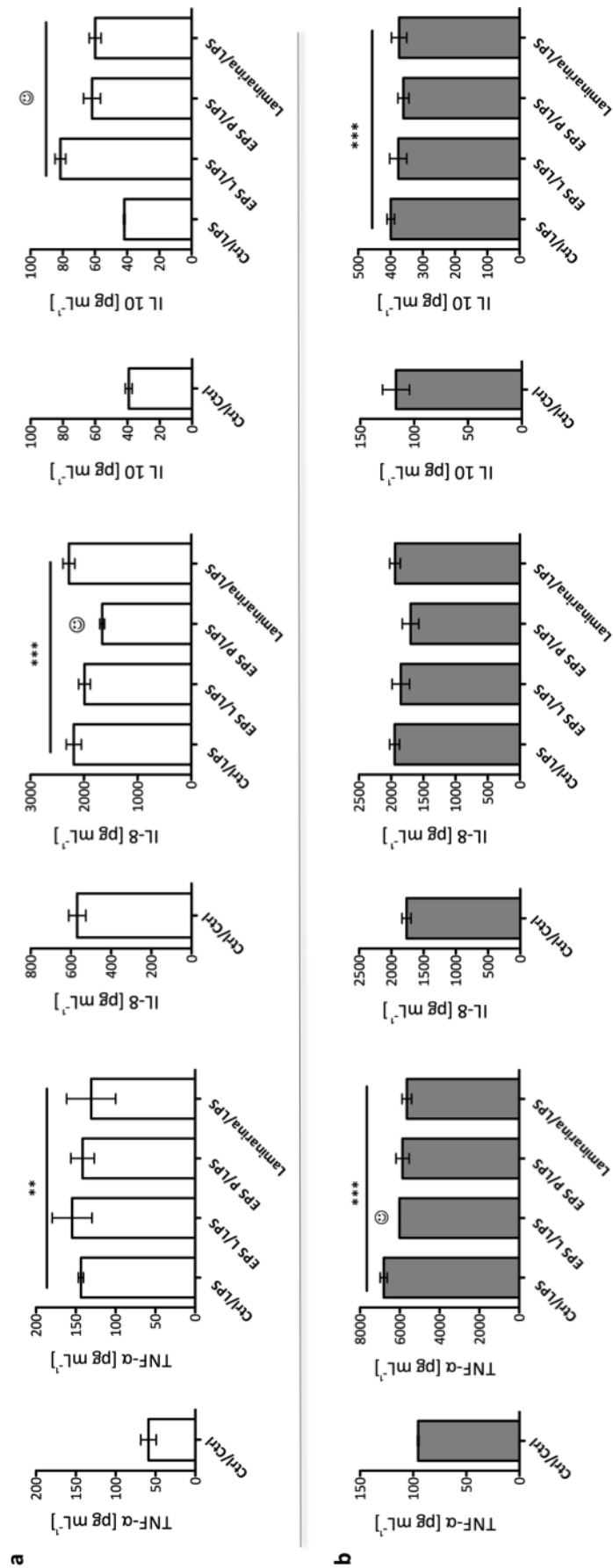


Figura 9. Efecto de los tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos durante 24 h en el modelo *in vitro* de mucosa intestinal inflamada en el compartimento superior (a) y en el compartimento inferior (b). En las células PMA-THP-1, en la muestra estimulada sólo con el LPS, se observaron unos niveles significativamente superiores para el TNF-α, respecto a la muestra no estimulada. Para la IL-8, el tratamiento con el LPS de las células PMA-THP-1 mostró un incremento de los niveles de esta citoquina en las células Caco-2, respecto al no estimulado. Sólo el co-tratamiento con los EPSs mostró diferencias significativas en los niveles de la IL-10 de las células Caco-2, respecto al control de inflamación. * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado); ☺ $p < 0,05$ (respecto al control estimulado con el LPS).

tratamientos con el LPS, y con cada uno de los tres (1-3)- β -D-glucanos (fig. 9a). Centrando el análisis en la línea PMA-THP-1, el co-tratamiento con los distintos polímeros conllevó a una ligera disminución de los altos niveles de TNF- α (más de 6800 pg mL⁻¹) provocados por el tratamiento con el LPS (fig. 9b). Los niveles de IL-8 sintetizados por las células PMA-THP-1, si bien fueron elevados (aproximadamente 2000 pg mL⁻¹), no se vieron afectados por las diferentes condiciones experimentales probadas (fig. 9b). Al tratarse de células implicadas en procesos inflamatorios, las PMA-THP-1 tratadas con el LPS secretaron unos niveles de IL-10 (400 pg mL⁻¹, fig. 9a) 10 veces superiores a los detectados para los enterocitos (fig. 9a); sin embargo, no se detectaron, para los macrófagos, diferencias en los perfiles de esta citoquina, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas (fig. 9b).

En conjunto, los resultados del co-tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos, durante 24 h, mostraron un efecto anti-inflamatorio reflejado en un aumento del marcador anti-inflamatorio (IL-10), y ejercido primordialmente en las células Caco-2.

3.4 Inmunomodulación de monocultivos de macrófagos PMA-THP-1 por los (1-3)- β -D-glucanos

Los resultados mostrados en el apartado anterior, no habían revelado en el modelo de “transwell”, que por transducción de la interacción polisacárido-Caco-2, los (1-3)- β -D-glucanos ejercieran un efecto anti-inflamatorio elevado sobre los macrófagos. Por ello, se analizó el efecto de dichos polímeros directamente sobre los macrófagos PMA-THP-1. Los tratamientos con los polisacáridos, en ausencia o presencia del LPS, se realizaron sin co-cultivo de células Caco-2, y a las 24 h, se determinaron los niveles de las citoquinas TNF- α e IL-10 (fig. 10).

Sin estimulación con el LPS, el tratamiento con los polisacáridos provocó una disminución significativa ($p < 0,05$) de los niveles del TNF- α , secretados por los macrófagos al sobrenadante (mostrando valores próximos al límite de detección de la técnica) (fig.10). Respecto a la IL-10, el tratamiento con el EPS L o el EPS P, y no con la laminarina, provocó un aumento significativo de aproximadamente 2 veces en la producción y secreción de dicha citoquina, por las células PMA-THP-1 (fig.10).

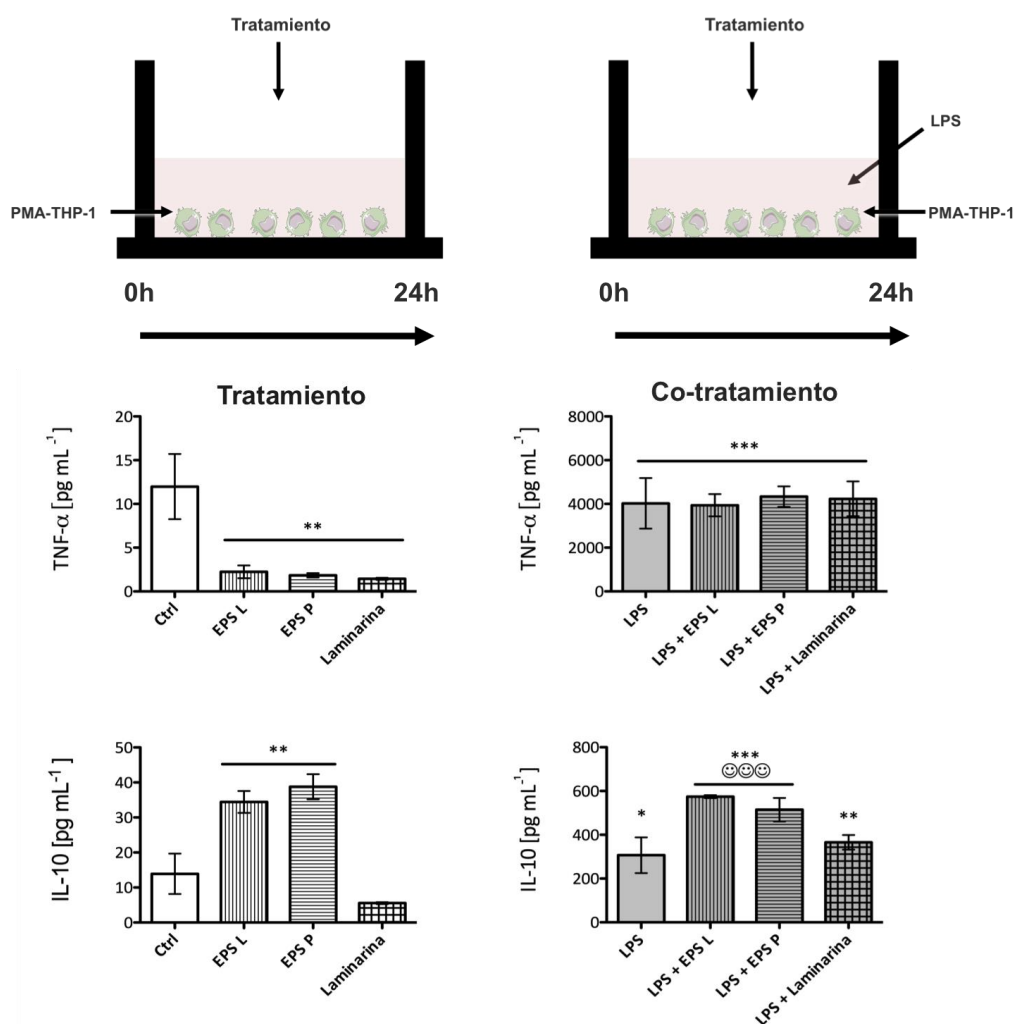


Figura 10. Efectos del tratamiento con los (1-3)-β-D-glucanos sobre un monocultivo de células PMA-THP-1. En la parte superior se representa el modelo experimental utilizado, en el cual se estimularon los macrófagos con LPS y se trataron con los EPSs, cuantificando los niveles de citoquinas secretadas (TNF-α, IL-10). Los niveles del TNF-α estuvieron próximos al límite de detección de la técnica ELISA, en ausencia del estímulo con el LPS; mientras que, la activación de las células con el lipopolisacárido produjo un drástico incremento de sus niveles, mayores en las muestras sometidas a los tratamientos con los EPSs y estabilizándose con los co-tratamientos. Los niveles de la IL-10 se incrementaron con los tratamientos, tanto en ausencia del LPS (salvo en presencia de la laminarina) como con los co-tratamientos (en el cual los niveles se incrementan drásticamente). * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado); ☺ $p < 0,05$ (respecto al control estimulado con el LPS).

Por otra parte, el tratamiento con el LPS indujo un drástico incremento tanto de los niveles del TNF-α (aproximadamente 400 veces), como de la IL-10 (aproximadamente 20 veces) (fig.10). Cuando los macrófagos fueron sometidos al co-tratamiento, los (1-3)-β-D-glucanos no fueron capaces de contrarrestar la inducción del TNF-α provocada por el LPS. Sin embargo, el tratamiento con los EPSs mostró tener un efecto de estimulación de la secreción de la IL-10 anti-inflamatoria

(triplicando aproximadamente los niveles detectados en presencia del LPS), mientras que el tratamiento con la laminarina no tuvo este efecto (fig.10).

Globalmente, se pudo observar que la respuesta de los macrófagos PMA-THP-1 al tratamiento con los tres (1-3)- β -D-glucanos, y al co-tratamiento de los EPSs (EPS P o EPS L), con el LPS, teniendo en cuenta la tasa inflamatoria (TNF- α /IL-10), era anti-inflamatorio, con un valor de 39 para LPS, 32 para EPS L, 29 para EPS P y 36 para la laminarina.

3.5 influencia de los (1-3)- β -D-glucanos sobre la expresión génica de células epiteliales y macrófagos en modelo *in vitro* intestinal de co-cultivo

A fin de validar y complementar algunos de los resultados obtenidos mediante el estudio de los niveles de citoquinas por los componentes del modelo intestinal, se determinaron, tanto en las células Caco-2 como en las PMA-THP-1, los niveles de expresión de los genes codificantes de las citoquinas IL-10 e IL-8. Además, ya que las células epiteliales [186], y no los macrófagos, sintetizan la TSLP (implicada en la maduración de los linfocitos T), también se estudió, a nivel transcripcional, la expresión de esta interleuquina en las células Caco-2. Los valores obtenidos, se normalizaron utilizando los niveles del mRNA de la proteína constitutiva PPIA. Estas determinaciones se efectuaron después de realizar estimulaciones, tratamientos o co-tratamientos durante 6 h y 24 h (figs. 11-13).

Después de 6 h de tratamiento, el análisis de la expresión génica para la IL-10, en las células Caco-2 (fig. 11 la), reveló un efecto inductor a nivel transcripcional de los EPSs, respecto al control sin tratar ($p < 0,05$), y este efecto no se observó tras la exposición a la laminarina. También, se detectó este resultado en todos los co-tratamientos, sin observarse una gran diferencia entre ellos y frente a la muestra estimulada *vía* interacción PMA-THP-1 (fig. 11 la). Además, cuando se activaron las

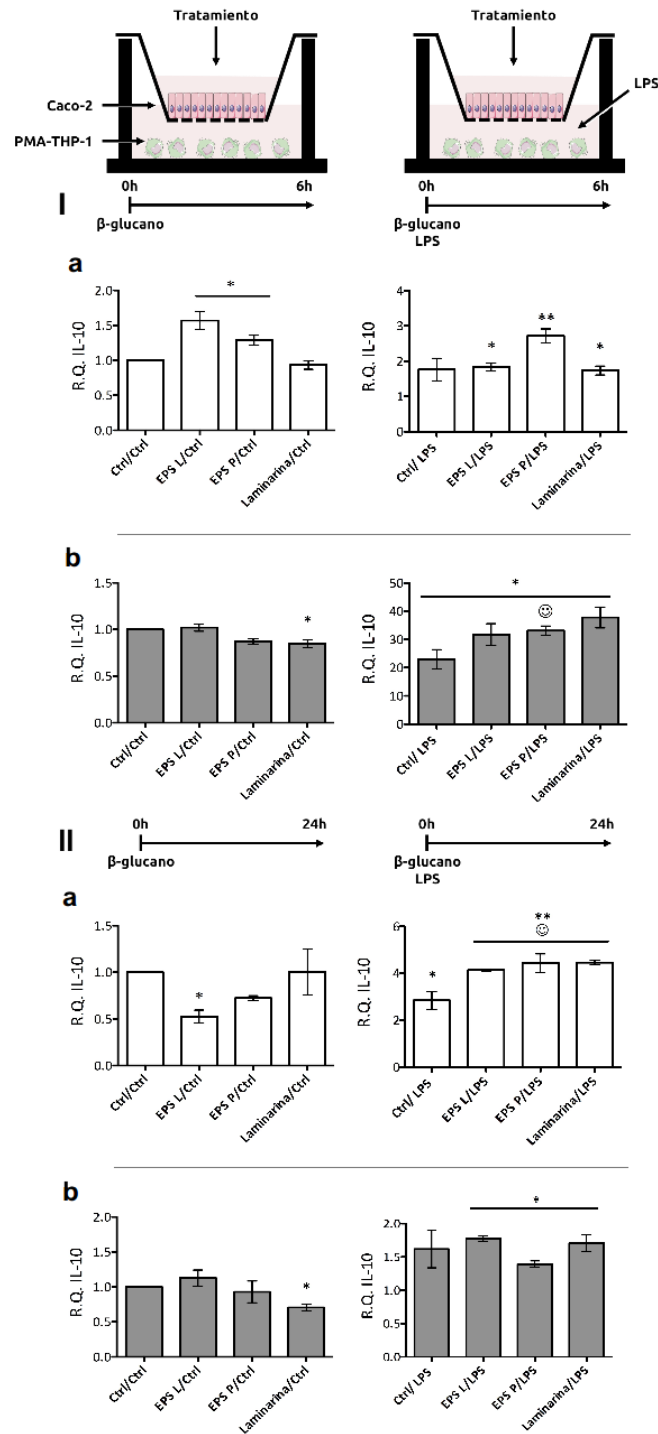


Figura 11. Efecto de los tratamientos durante 6 h (I) y 24 h (II) con los (1-3)-β-D-glucanos en el modelo de co-cultivo de mucosa intestinal inflamada sobre la expresión génica de la IL-10 en el compartimento superior (a) y en el compartimento inferior (b). Parte superior, esquema de los experimentos. A las 6 h, los niveles de mRNA en las células Caco-2 tratadas con los EPSs mostraron niveles significativamente superiores respecto a las células no tratadas. En las células PMA-THP-1, después de 6 h, el tratamiento con el LPS provocó un drástico incremento en los niveles de expresión de la IL-10, que se incrementó con los co-tratamientos, hasta alcanzar niveles de hasta 40 veces superiores a los de las muestras no tratadas. A las 24 h, estos altos niveles del transcrito decrecieron en los macrófagos expuestos al LPS o a los co-tratamientos. Sin embargo, en las células Caco-2 los niveles del mismo se incrementaron, y más acusadamente en los co-tratamientos. * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado); ☺ $p < 0,05$ (respecto al control estimulado con el LPS).

células Caco-2 por la transducción de señal LPS-PMA-THP-1, los niveles de la IL-10 fueron aproximadamente 2 veces superiores a los observados en los “*transwell*” no estimulados (fig. 11 Ib). En cuanto al comportamiento de las PMA-THP-1, se observó una tendencia a la reducción de los niveles de expresión de la IL-10, en respuesta a los tratamientos con los polisacáridos (fig. 11 Ib), siendo significativa para el tratamiento con la laminarina ($p < 0,05$); mientras que la estimulación con el LPS desencadenó un elevado incremento en los niveles de la expresión génica de esta interleuquina (fig. 11 Ib), superior en las células tratadas con los polisacáridos, y significativa ($p < 0,05$) respecto a las muestras no tratadas. Además, en el caso del tratamiento con el EPS P, estos valores fueron significativamente superiores al control estimulado con el LPS ($p < 0,05$) (fig. 11 Ib).

Tras 24 h de tratamiento con los polisacáridos, se observó que los tratamientos provocaban, en las células Caco-2 (fig. 11 IIa), una ligera reducción en la expresión de la IL-10, principalmente los EPSs y en particular el EPS L ($p < 0,05$), con niveles también significativos respecto a la muestra estimulada con el LPS ($p < 0,05$) (fig. 11 IIa). El co-tratamiento β -glucanos-Caco-2 y LPS-PMA-THP-1 provocó un incremento en los niveles de expresión de la IL-10 frente a las muestras no tratadas ($p < 0,05$), y con niveles también más elevados que los detectados en la muestra estimulada con el LPS ($p < 0,05$) (fig. 11 IIa), siendo este efecto superior al observado después de 6 h de co-tratamiento (fig. 11 Ia). Al analizar las células PMA-THP-1, se comprobó que los valores de expresión de la IL-10 no se afectaron significativamente en los tratamientos con los (1-3)- β -D-glucanos; salvo en el caso de la laminarina, que provocó una reducción significativa ($p < 0,05$) en los niveles de esta citoquina respecto a la muestra no tratada (fig. 11 IIb). Además, después de las 24 h de estimulación con el LPS o de co-tratamiento (fig. 11 IIb), no se observó la elevada inducción (20-40 veces) detectada a las 6 h (fig. 11 Ib). Sin embargo, el tratamiento con los polisacáridos, produjo un aumento significativo de los niveles del transcrito que codifica la IL-10 ($p < 0,05$), respecto al control no tratado; y además, para las muestras co-tratadas con el EPS L o la laminarina, estos valores de la IL-10 fueron superiores al control estimulado sólo con el LPS (fig. 13).

Por otra parte, después de 6 h, el tratamiento con los EPSs (y no con la laminarina), fue capaz de activar, de manera significativa ($p < 0,05$), la expresión génica de la IL-8 en las células Caco-2 (fig. 12 Ia). También, se detectó una inducción de la expresión génica respecto al control no tratado, con todos los polisacáridos (45-60 veces), en co-tratamiento con el LPS, siendo dicha estimulación superior a la detectada en los tratamientos con los EPSs (4-8 veces) y con la estimulación con sólo el LPS (aproximadamente 20 veces) (fig. 12 Ia). Sin embargo, en las células PMA-THP-1, los niveles de expresión de la IL-8 se mantuvieron inalterados con los tratamientos (fig. 12 Ib). Sólo al estimular los macrófagos con el LPS, se desencadenó la sobreexpresión de esta interleuquina (100-150 veces, respecto al control no tratado), observándose una tendencia de aumento con el co-tratamiento con los tres (1-3)- β -D-glucanos (fig. 12 Ib). Después de 24 h, el tratamiento con los polisacáridos provocó una reducción significativa (2-3 veces) de la expresión de la IL-8, en las células Caco-2 (fig. 12 IIa).

Además, no se observó la elevada inducción de la expresión génica de la IL-8, detectada a las 6 h en condiciones de estimulación o co-tratamiento. Sólo se detectó un incremento significativo (2 veces) respecto al control no tratado, cuando se utilizó la laminarina ($p < 0,05$).

Los tratamientos durante 24 h con los (1-3)- β -D-glucanos no mostraron tener efecto sobre los niveles de expresión de la IL-8 en los macrófagos PMA-THP-1 (fig. 12 IIb). Pero, esta situación se revirtió al activarlas con LPS, situación en la que sus valores aumentaron significativamente (aproximadamente 10 veces) en todos los experimentos ($p < 0,05$), si bien, los niveles encontrados en los co-tratamientos, fueron similares a los detectados en las muestras estimuladas sólo con LPS (fig. 12 IIb).

Finalmente, el análisis de los niveles de expresión génica de la citoquina proinflamatoria TSLP, en las células Caco-2, reveló que sus niveles no se alteraron a 6 h de tratamiento con los EPSs (fig. 13 Ia), así como la estimulación con LPS no ejerció

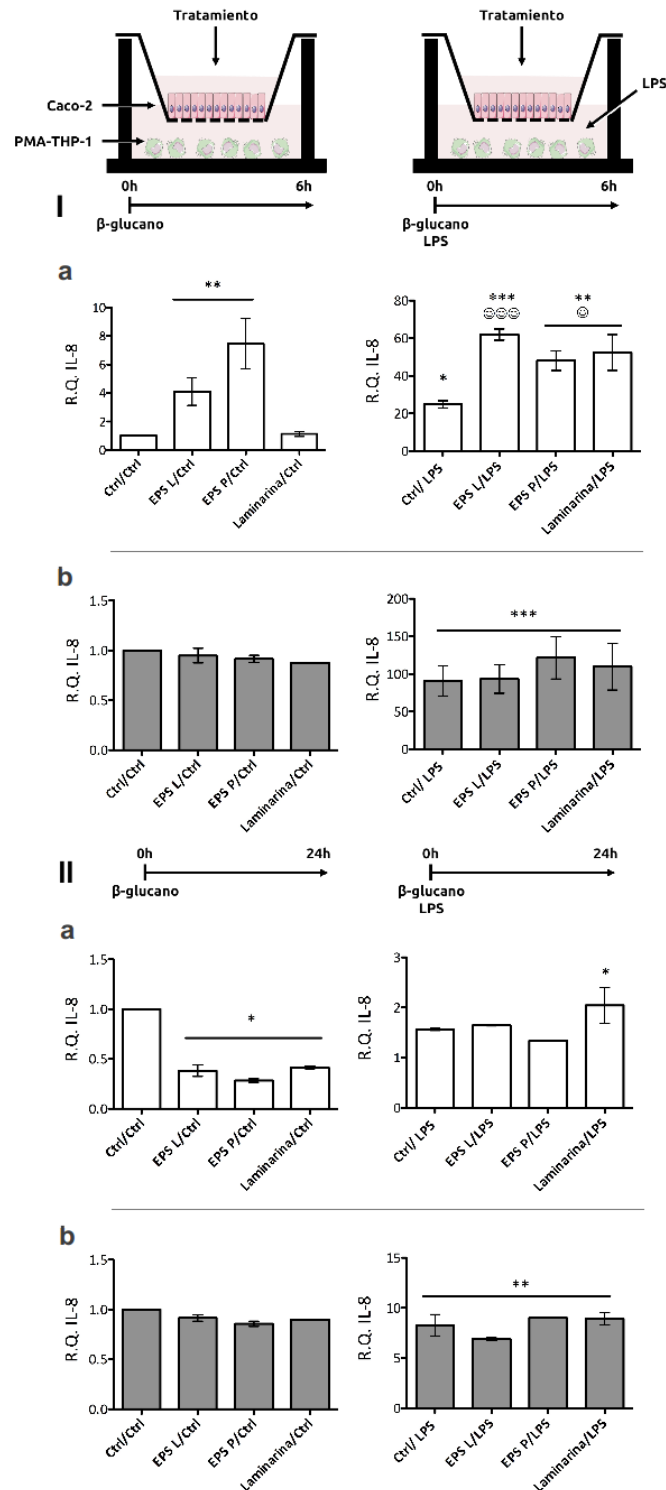


Figura 12. Efecto de los tratamientos durante 6 h (I) y 24 h (II) con los (1-3)-β-D-glucanos sobre la expresión génica de la IL-8 en el modelo de co-cultivo de mucosa intestinal inflamada en el compartimento superior (a) y en el compartimento inferior (b). En células Caco-2 tratadas durante 6 h, se detectaron niveles significativamente superiores respecto a los niveles basal e inflamatorio (con LPS), entre 8 y 6 veces respectivamente. La estimulación de las células PMA-THP-1 durante 6 h, produjo un aumento de los niveles de esta citoquina, muy elevados con respecto al valor basal sin tratamiento. Después de 24 h, las células Caco-2 mostraron niveles de mRNA más bajos que el control, mientras que aumentaron con el proceso inflamatorio. Los macrófagos PMA-THP-1 sólo mostraron variaciones en los niveles de la IL-8 al estimularse con LPS, aumentando sus niveles respecto al basal. * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado); ☺ $p < 0,05$ (respecto al control estimulado con el LPS).

ningún efecto (fig. 13 Ia). A las 24 h, este comportamiento varió, de forma que, los niveles de expresión génica del TSLP en los enterocitos, fueron inferiores a los de las células no tratadas en todas las condiciones estudiadas (fig. 13 IIa), y además, la estimulación de las células PMA-THP-1 con el LPS, provocó que las células Caco-2 respondieran con una mayor reducción de estos niveles, salvo en el caso del EPS P, que no afectó a los niveles de expresión (fig. 13).

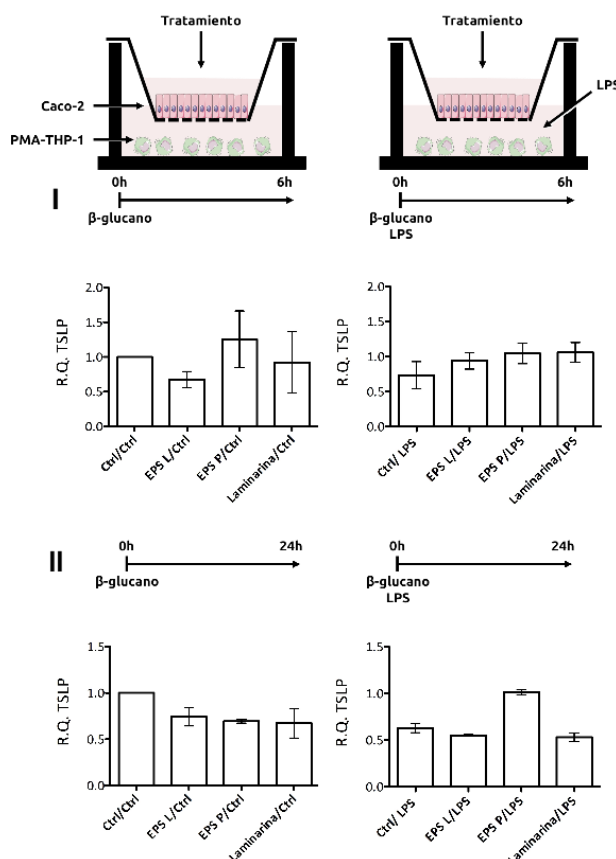


Figura 13. Efecto de los tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos durante 6 h (I) y 24 h (II) sobre la expresión génica del TSLP en las células Caco-2 del modelo de co-cultivo de mucosa intestinal inflamada. A las 6 h, los niveles del transcrito para esta citoquina mostraron una tendencia a ser mayores con los tratamientos en condiciones de inflamación, pero alcanzando valores similares a los del control basal. Después de 24 h, las células Caco-2 mostraron una reducción de los niveles de esta citoquina en respuesta a los tratamientos y, de forma más acusada, cuando las células PMA-THP-1 fueron estimuladas con el LPS.

En conjunto, los resultados del análisis de qPCR en el modelo *in vitro* de mucosa intestinal inflamada, en respuesta al tratamiento con los (1-3)-β-D-glucanos, mostraron un efecto anti-inflamatorio, con aumento de la expresión de la IL-10 y una estabilización de los niveles de la IL-8, en las células epiteliales, y también, en macrófagos, para esta última. Al mismo tiempo, la expresión del TSLP no mostró

variaciones entre 6 h y 24 h, con los tratamientos y en respuesta a la inflamación, indicando que los (1-3)- β -D-glucanos no activaron la diferenciación de los linfocitos.

4. DISCUSIÓN

El modelo de co-cultivo de las células epiteliales Caco-2 y de los macrófagos PMA-THP-1, se utiliza comúnmente para reproducir, *in vitro*, las condiciones de la mucosa intestinal y el sistema inmune humano asociado [180]. El uso de los insertos “*transwell*”, permite la comunicación de ambos tipos celulares en cultivo, y además, el análisis independiente de dichas células, así como del medio de sus respectivos compartimentos.

En este capítulo, se ha estandarizado la utilización de este modelo *in vitro*, y se ha investigado su potencial para evaluar los efectos de dos (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2, de origen bacteriano (producidos por *L. lactis* y *P. parvulus* 2.6), en comparación con la laminarina, otro (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-6, y sintetizado por el alga marrón *Laminaria digitata*. Este estudio se centró en determinar los efectos que el tratamiento con estos polisacáridos pudiera tener en la modulación de la respuesta inflamatoria, mediada por PMA-THP-1, y desencadenada por el LPS, en ambos tipos celulares; y cómo esta respuesta podría estar relacionada con el tipo de polímero y con la duración del co-tratamiento.

Por ello, en este trabajo de Tesis se descartaron posibles efectos citotóxicos de los β -glucanos sobre la barrera intestinal, valorando la tasa metabólica celular, tanto en monocapa en vía de diferenciación (situación similar a una úlcera intestinal, en la que células epiteliales con alto poder de proliferación migran para recomponer el daño tisular) (fig. 4a), como en monocapa diferenciada (simulando las condiciones normales del lumen intestinal, en la que las células pierden su capacidad proliferativa) (fig. 4b). En ambos casos, los tratamientos con cada uno de los tres polisacáridos (a las concentraciones estudiadas) no mostraron efectos citotóxicos, y por tanto, no alteraron el equilibrio funcional de los enterocitos.

De igual modo, se comprobó el funcionamiento del modelo *in vitro*, estimulando con el LPS las células PMA-THP-1, que en respuesta secretaron niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias (fig. 5b). Hay que resaltar, que también las células Caco-2 respondieron a dicho estímulo, secretando las citoquinas TNF- α , IL-8 e IL-10 verificando el modelo de mucosa intestinal inflamada (fig. 5a).

La línea de células Caco-2 ha sido utilizada en trabajos previos, para el estudio *in vitro* de la inflamación de la mucosa intestinal, inducida por las citoquinas IL-1 β o TNF- α , que estimulan la secreción de IL-8 (marcador de inflamación epitelial) [187]. Así, el tratamiento LPS-PMA-THP-1, determina un aumento de dichas citoquinas pro-inflamatorias, que son capaces de estimular a los enterocitos a través de la membrana basal [187]. Además, las células Caco-2, se diferencian de forma autónoma a enterocito polarizado (con una parte apical, lumen, y otra basolateral, lámina propia), y por ello, la respuesta a la estimulación puede variar en función de los receptores expresados en ambas membranas [187]. De hecho, ha sido descrito que la adición del TNF- α a su membrana basal, provoca un incremento de la secreción de la IL-8 en ambos compartimentos [187]; tal y como ocurrió en este trabajo de Tesis, cuando al realizar el estímulo LPS-PMA-THP-1, se secretaron citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α e IL-8 (fig. 5). Sin embargo, tanto la estimulación de la membrana basolateral de las células Caco-2, por adición del LPS al compartimento inferior, en ausencia de los macrófagos (fig. 6), como la estimulación directa de la membrana apical de los enterocitos con LPS en presencia de las células PMA-THP-1 (fig. 7), no provocaron una respuesta inflamatoria, a pesar de que, en estas membranas se expresan receptores TLR-4, que reconocen el LPS, y que bajo un estímulo inflamatorio suelen aumentar para favorecer la permeabilidad [93, 185, 188] . En consecuencia, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, revelaron que el modelo de inflamación, más adecuado, para el co-cultivo de las células epiteliales intestinales Caco-2 con las células PMA-THP-1, dependía de la estimulación de los macrófagos con el LPS.

Con el modelo *in vitro* ya establecido, se analizó cómo afectaba el tratamiento de las células Caco-2 con los (1-3)- β -D-glucanos, a nivel de modulación de la respuesta

inmunitaria e inflamatoria, en un entorno de inflamación de la mucosa intestinal, provocada por la estimulación de los macrófagos por el LPS. El efecto global detectado con los EPSs, indicó una modulación de la respuesta de las dos líneas celulares, con una tendencia a aumentar la concentración de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, y a reducir los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-8 (fig. 8 y 9).

La laminarina, que se eligió como término de comparación de los EPSs, destacó por sus efectos a corto plazo (6 h), modulando el sistema *in vitro*, principalmente a través de la IL-8, en ambas líneas celulares, determinado su aumento en las células Caco-2 y su disminución en las PMA-THP-1; y compartiendo los efectos de los EPSs sobre las Caco-2 para el TNF- α y la IL-10 (fig. 8). Estas diferencias podrían ser el reflejo de sus diferentes estructuras (EPSs *versus* laminarina). Otra diferencia detectada, fue el mayor efecto a corto plazo del EPS L, para reducir la producción del TNF- α y aumentar los niveles de la IL-10, en las células PMA-THP-1 (fig. 8); mientras que, el EPS P, tuvo éxito a largo plazo (24 h), provocando una reducción de la IL-8 en las células Caco-2 (fig. 9); disimilitudes que, asimismo, podrían estar relacionadas con la diferente masa molecular de estos EPSs (capítulo 1 de este trabajo y Werning et al., 2014) [65]. Además, el diverso comportamiento de los (1-3)- β -D-glucanos, podría tener un papel beneficioso en diferentes situaciones como los procesos inflamatorios normales y los procesos inflamatorios crónicos: en el primer caso, el EPS L y la laminarina, y en el segundo, el EPS P. La modulación de esta citoquina, IL-8, resulta importante, puesto que está involucrada en la regulación de la homeostasis del intestino modulando su permeabilidad luminal; siendo, esta modulación, requerida para reclutar los componentes del sistema inmune y para evitar su reiterada producción, que puede provocar daños en la estructura del tejido intestinal [189].

Los tiempos de incubación durante los tratamientos, parecieron ser de gran importancia a la hora de promover una respuesta diferencial de las células en cultivo; pudiendo observarse, lo que podrían denominarse, diferentes etapas de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Los macrófagos presentaron una respuesta

más temprana respecto a las células epiteliales (figs. 8 y 9, 6 h *versus* 24 h), reflejada en una reducción de los marcadores inflamatorios y en el aumento de los anti-inflamatorios. Por otra parte, en condiciones sin estimulación con LPS, también se observó que los (1-3)- β -D-glucanos generaban una respuesta en ambos tipos celulares, que afectaba a la producción de citoquinas, y que se modulaba con el tiempo (resultados no mostrados).

Para valorar si existían diferentes respuestas entre el tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos recibido a través de las Caco-2 versus PMA-THP-1, y el tratamiento directo, se decidió valorar la influencia de los polisacáridos sobre las PMA-THP-1. Los macrófagos estimulados con LPS, mostraron una reducción de la tasa inflamatoria, sólo cuando se trataron con los EPSs (fig. 10); confirmando un efecto diferencial de los EPSs y la laminarina. Además, la capacidad de los tres polisacáridos para reducir los muy elevados niveles de TNF- α inducidos por el LPS (fig. 10), si bien baja, estuvo correlacionada con los datos obtenidos en condiciones de co-cultivo (fig. 8 y 9); y confirmaron que se producía la transducción de señal (1-3)- β -D-glucanos-Caco-2 a los macrófagos en el modelo de “*transwell*” seleccionado en este trabajo de Tesis.

Así, para completar el estudio de la influencia de los EPSs en el modelo de co-cultivo, se analizaron, en los enterocitos y macrófagos, niveles de expresión génica por RT-PCR. De esta forma, se comprobó, nuevamente, como el tratamiento con los tres (1-3)- β -D-glucanos produjo un aumento significativo de la producción y secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en ambos tipos celulares (fig. 11), y de manera diferida: primero en las PMA-THP-1 y después en las Caco-2. En cambio, el análisis de la IL-8 mostró una activación de su expresión génica a las 6 h, significativa para las Caco-2 (fig. 12 Ia); seguida de una normalización de la expresión a 24 h (fig. 12 Ib). Esta activación, podría estar relacionada con el papel que tiene dicha citoquina en la respuesta inflamatoria por parte del epitelio intestinal; siendo esta interleuquina específica de este tejido. En respuesta a un estímulo en la membrana basolateral, las células Caco-2 deberían responder con una secreción apical-basolateral que llevaría a un reclutamiento de células inmunitarias hacia la lámina propia y a una mejora en la restitución epitelial luminal [187], favoreciendo por tanto los mecanismos de

resolución de la inflamación y reparación tisular. Finalmente, el estudio de la expresión de la citoquina TSLP, implicada en la maduración de los linfocitos T, y específica del tejido epitelial, no mostró variaciones a las 6 h (fig. 13 I), mientras se produjo una disminución a las 24 h (fig. 13 II), en las células Caco-2.

En resumen, se confirmó la inmunomodulación por los (1-3)- β -D-glucanos en el modelo *in vitro* de inflamación intestinal, de forma que, la estimulación de las células PMA-THP-1 con el LPS, desencadenó los mecanismos celulares de respuesta en las mismas y en las células Caco-2. Por tanto, el LPS activa las cascadas moleculares de inflamación en ambos tipos celulares, que junto con el tratamiento con los polisacáridos, induciría en primer lugar una respuesta inmediata a través de la activación de la producción y secreción de la IL-8 por parte del epitelio y un descenso del TNF- α , que estimularía, a su vez, la respuesta de los macrófagos, incrementando los niveles de la IL-10; para, posteriormente, producir una respuesta diferida o tardía, en la que se aumentaría la producción y secreción de la IL-10, y el descenso de la IL-8, por parte del epitelio intestinal y por parte de los macrófagos. Asimismo, la falta de activación del TSLP podría estar relacionada con el carácter anti-inflamatorio de los (1-3)- β -D-glucanos, que podría tener un significado en las enfermedades inflamatorias intestinales, en donde los procesos de activación de las células T, determinan la cronicidad de estas patológicas. Globalmente, y por tanto, en este trabajo de Tesis se han comprobado y demostrado los efectos anti-inflamatorios del tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos, y en concreto de los EPSs (EPS P y EPS L), aunque con diferencias en su comportamiento, en dicho modelo *in vitro*, que podría ser el reflejo de los diferentes pesos moleculares [65].

CAPÍTULO 4

**Efecto de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2 en modelo
ex vivo de biopsias de pacientes de enfermedad de Crohn**

1. INTRODUCCIÓN

El intestino de los seres humanos adultos posee una microbiota compuesta por aproximadamente de 10^{11} a 10^{12} microorganismos por gramo de contenido, siendo la mayoría bacterias anaerobias, y entre ellas del 80 al 90% pertenecen a los filos taxonómicos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* [190]. Además, el tracto gastrointestinal, es una de las principales áreas de contacto con toxinas y alérgenos, así como con microorganismos potencialmente dañinos, como bacterias y virus. El mucus es la primera barrera frente a ellos, y juega un papel clave en la defensa del organismo. Por otra parte, la microbiota intestinal, es capaz de utilizar un gran número de polisacáridos endógenos como mucinas y también oligosacáridos, polisacáridos y fibras de diferentes orígenes, incluidos en alimentos funcionales [191, 192] que, tras su fermentación, originan subproductos beneficiosos para el huésped. La microbiota de individuos sanos ejerce una función protectora, no sólo por competencia con los patógenos, sino también por estimular el sistema inmune, gracias a su interacción con una mucosa intestinal estructural y funcionalmente adecuada [193].

La microbiota contribuye al desarrollo del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), que polariza la respuesta del sistema inmune y previene la colonización por patógenos. En consecuencia, la microbiota intestinal tiene un amplio efecto en la respuesta inmune innata y adaptativa. En individuos sanos, la respuesta inmune innata involucra a las células presentadoras de antígeno (CDs y macrófagos), que producen grandes cantidades de la IL-10 al enfrentarse a estímulos microbianos. En la homeostasis adaptativa, las células T son clave para el desarrollo de la tolerancia inmune. En este proceso, las CDs captan los estímulos del ambiente externo con sus prolongaciones, y se dirigen a los nodos linfáticos mesentéricos promoviendo la recirculación de células T, en el proceso denominado “*homing*”. Cuando estas células vuelven al intestino, algunas de ellas se han diferenciado a un subgrupo regulador denominado células T Foxp3+ que, tras reconocer a antígenos de la microbiota comensal, desarrollan una respuesta de tolerancia, en la que se produce liberación de citoquinas reguladoras como la IL-10 [194]. Por su parte, las células B asociadas al intestino, también tienen un papel importante en la homeostasis de la microbiota,

produciendo grandes cantidades de IgA que, al liberarse en el lumen intestinal, recubre las bacterias comensales con el fin de evitar su unión al epitelio y la consiguiente penetración en la lámina propia y agresión al hospedador [195].

De esta manera, la microbiota tiene una profunda implicación en la respuesta del sistema inmune y, no es sorprendente, que especies pertenecientes a la microbiota normal, estén involucradas en enfermedades autoinmunes. Pero, en general, la microbiota intestinal garantiza la homeostasis entre el hospedador y el sistema inmune, existiendo una retroalimentación constante que mantiene al sistema inmune preparado, con todas sus funciones preservadas, para responder rápidamente cuando se produce una situación adversa. Así, cuando se produce una disbiosis de la microbiota, la cooperación entre ambos sistemas se ve alterada, llevando a un proceso patológico [196]. Diversos estudios han sugerido el papel que juegan algunas bacterias en el desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales (IBD, “*inflammatory bowel disease*”), como la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa [197]. Cuando, por causas desconocidas, hay una pérdida del control del sistema inmune intestinal, se producen unas tasas de inflamación elevadas y reiteradas en el lumen intestinal [198], que, a su vez, producen la selección de determinadas especies colitogénicas de la microbiota. Esta alteración de la mucosa intestinal, estimula la producción y liberación de gran cantidad de citoquinas, que conllevan la generación de un estado inflamatorio crónico. En consecuencia, se produce una rápida destrucción de la barrera física constituida por el epitelio, produciendo cambios patológicos como el crecimiento bacteriano incontrolado, implicando una mayor susceptibilidad a contraer infecciones y a la translocación de bacterias a través de la mucosa [199].

Debido a las funciones beneficiosas del microbioma, en la actualidad existen nuevas estrategias terapéuticas, que implican el uso de cepas probióticas, como *L. rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Saccaromyces boulardii*, *E. coli* Nissle 1917 y *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (algunas de ellas, productoras de EPSs) [200, 201]; que contribuyen a la disminución del grado de inflamación, debido a su capacidad de reducir la adhesión de patógenos

al epitelio intestinal, bloqueando su sitio de unión e incrementando la producción de sustancias antibacterianas en este hábitat [202, 203]. Además, los probióticos modifican la liberación de citoquinas por parte del epitelio e inhiben el factor de transcripción NFkB, llevando a una mejoría de la inflamación intestinal [203-205]. En este contexto, los EPSs con actividad prebiótica, como el (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición O-2 [44], que estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas, como las BAL, poseen potencial como coadyuvantes en el tratamiento de las IBD. Esta función, es más plausible teniendo en cuenta que los β -glucanos juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune innata, a través de la interacción con CDs y macrófagos, y en la modulación de la respuesta inmune adaptativa, aumentando la proliferación de células T y NK a través de la liberación de citoquinas [191, 194, 206].

Con estos antecedentes y los resultados obtenidos en los modelos *in vitro* descritos en los capítulos 2 y 3 de este trabajo, que indicaban que el EPS L y el EPS P poseen actividad antiinflamatoria, los (1,3)- β -D-glucanos con sustituciones en posición O-2 eran candidatos potenciales para ser utilizados en la terapia de la IBD. Por este motivo, en este capítulo se evaluó el efecto inmunomodulador del EPS L y del EPS P, utilizando un modelo *ex vivo* de biopsias de mucosa intestinal de pacientes afectados por la EC, tanto a nivel proteico como a nivel de la expresión génica; haciendo una incursión en el estudio de vías de señalización reguladas por el factor transcripcional NFkB.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestras

Se incluyeron en el estudio muestras de pacientes con EC sometidos a intervención quirúrgica programada. Las biopsias del tejido intestinal se mantuvieron en frío a 4 °C, desde su recogida, hasta su posterior manipulación.

El estudio se realizó en el laboratorio del Dr. Francisco Guarner, en el Institut de Recerca Vall d'Hebron, y fue aprobado por el Comité Ético del Centro. Todos los

pacientes incluidos prestaron su consentimiento informado para la utilización de sus muestras para dicho estudio.

2.2 Modelo *ex vivo*

A partir del tejido se separó la mucosa intestinal y se troceó en piezas de aproximadamente 25-35 mg de peso, haciendo una distribución equitativa de la lesión macroscópica. Cada pieza fue colocada sobre el inserto, en el pocillo de la placa de cultivo (Netwell culture system, Costar), con la mucosa dispuesta hacia la parte superior, y seguidamente cultivada en medio de cultivo RPMI (CanSera) sin antibiótico (37 °C, 90% O₂, 10% CO₂ -carbógeno-). Antes de su utilización, el medio de cultivo fue filtrado a través de una membrana de 0,22 µm, atemperado a 37 °C y gaseado durante 90 min con carbógeno.

Los tejidos se trataron independientemente con el EPS L, el EPS P o la laminarina, utilizándose como control el tejido mantenido sólo en medio de cultivo. La solución de tratamiento a 100 µg x mL⁻¹ para cada (1-3)-β-D-glucano (en medio de cultivo), se depositó por goteo sobre los tejidos. Luego, se colocó la tapa sobre la placa (sobre la que hay unos soportes que permiten y aseguran un correcto intercambio de gases) y se dispuso en un baño a 37 °C, con un recipiente con un paño humedecido. El recipiente se conectó a la toma de gas carbógeno, se gaseó a alta presión durante 10 s, y se incubó durante 4 h, gaseando durante 10 s en intervalos de 1 h.

Al finalizar el experimento, se recogieron alícuotas del sobrenadante de cada pocillo, y se almacenaron a -80 °C; mientras que, el tejido, se mantuvo en presencia de 400 µL de solución de estabilización del RNA “*RNA later*” (Ambion) a 4 °C durante toda la noche, y después se almacenó a -80 °C.

2.3 Determinación de los niveles de citoquinas

En los sobrenadantes de los cultivos de tejidos se valoraron las citoquinas IL-10, TNF-α e IL-8, como se ha descrito en el apartado 2.4.1 del capítulo 2, y en el apartado 2.4 del capítulo 3 de este trabajo.

2.4 Extracción del RNA total

La extracción del RNA de las biopsias de los pacientes, se realizó empleando el Kit RNeasy mini (Qiagen), siguiendo las instrucciones de los proveedores.

Brevemente, se tomaron las muestras de las biopsias y se depositaron en tubos “*Lysing Matrix D*” para lisis de tejidos blandos (MP Biomedicals), junto con 600 μL del tampón de lisis RLT (MP Biomedicals) y 60 μL de β -mercaptoetanol. Para su homogenización, se utilizó el disruptor de células FastPrep FP120 (Thermo) a $6\text{ m} \times \text{s}^{-1}$ durante 40 s. Este proceso se repitió hasta la lisis total del tejido, a intervalos de 5 min, durante los cuales el tejido se mantuvo en hielo. El lisado tisular se transfirió a un microtubo, y se centrifugó a $14.000 \times g$ durante 3 min, en una centrífuga 5415R (Eppendorf). El sobrenadante, se transfirió a un nuevo microtubo, conteniendo 600 μL de etanol al 70 %, y después de agitar la mezcla, se transfirió a una columna de extracción RNeasy y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 15 s, eliminando, a continuación, el eluido; repitiendo el proceso con el volumen de muestra restante. Luego, se añadieron 350 μL de tampón de lavado RW1 (MP Biomedicals I) a la columna y se centrifugó a $8.000 \times g$ durante 15 s; tras lo que se eliminó el eluido y se añadieron 27 kU de DNasa I a la columna, dejando actuar el enzima durante 15 min a temperatura ambiente. Nuevamente, se añadieron 350 μL de tampón RW1 a la columna y se centrifugo a $8.000 \times g$ durante 15 s, descartando el eluido. A continuación, se añadieron 500 μL de tampón RPE (MP Biomedicals) a la columna y se centrifugó a $8.000 \times g$ durante 30 s, descartando el eluido, y repitiéndolo el proceso dos veces. Para recuperar el RNA extraído del tejido, se colocó la columna sobre un nuevo microtubo, se añadieron 30 μL de agua ultrapura (libre de DNA y RNA) sobre la membrana de la columna, y se centrifugó a $8.000 \times g$ durante 1 min. Una vez se recogió el RNA en el eluido, se alicuotó y almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,para su posterior uso.

Como se ha descrito en el apartado de Materiales y métodos del capítulo 3 de este trabajo, la concentración e integridad del RNA se analizó y determinó con el RNA 6000 Nano Chip, en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

2.5 Reacción de qPCR

Se utilizó la técnica de PCR cuantitativa con sondas Taqman, para la cuantificación relativa (frente al gen endógeno PPIA) de la expresión de los genes: TSLP, IL-12p35, IL-10 e IL-8; en las muestras de pacientes de EC tratadas con EPSs.

El procedimiento empleado para la síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de los tejidos, así como la qPCR, se realizó según el protocolo descrito en el apartado 2.6 del capítulo 3 de este trabajo.

2.6 Estudio de las vías de señalización del factor de transcripción NFkB

Con el objetivo de analizar la vía de señalización del NFkB humano, se empleó el sistema “*RT2Profiler PCR array*” (SABiosciences-Qiagen), que permite obtener el perfil de expresión de 84 genes fundamentales de dicha vía. El sistema, incluye una placa de microtítulo conteniendo, en los distintos pocillos, oligonucleótidos específicos para genes que codifican miembros de las familias de Rel, NFkB e IkB, genes de respuesta a NFkB, ligandos extracelulares y receptores que activan la vía, quinasas y factores de transcripción que propagan la señal (tabla 1). Además, en la propia placa de 96 pocillos, vienen también incorporados 5 pocillos con oligonucleótidos específicos de genes constitutivos, para la cuantificación relativa de la expresión, 1 pocillo como control negativo de DNA genómico, 3 pocillos como control de la transcripción reversa y 3 pocillos como control positivo de la PCR.

El análisis con el “*array*” se realizó según las instrucciones del fabricante, como se resume a continuación. Primero, se sintetizó el cDNA a partir de las muestras de RNA (obtenidas de las biopsias de los pacientes) empleando el kit “*RT² First Strand*” (Qiagen). Para ello, fue necesario eliminar con anterioridad el DNA genómico; de forma que se preparó una mezcla de reacción, conteniendo 1 µg de RNA, 2 µL del tampón GE 5X de eliminación de gDNA (Qiagen) y agua libre de RNasas, hasta un volumen final de 10 µL, incubando la mezcla a 42 °C durante 5 min y luego a 4 °C durante un 1 min. Una vez listas las muestras, se preparó la solución para la RT mezclando 4 µL de tampón BC3 5X de transcripción reversa (Qiagen), 1 µL de la mezcla P2 de cebadores y control externo (Qiagen), 2 µL de la mezcla RE3

conteniendo la transcriptasa reversa MMLV (Qiagen) y 3 μL de agua libre de RNasas. A la muestra de RNA, se le añadieron 10 μL de la mezcla de la solución RT y la reacción se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) con el programa: 42 °C durante 15 min y 92 °C durante 5 min. Una vez finalizada la síntesis de cDNA, se añadieron 91 μL de agua libre de RNasas a cada muestra para continuar con el protocolo para la qPCR, o bien se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización. La qPCR se llevó a cabo añadiendo 25 μL , por pocillo, de la mezcla “*mastermix RT² SYBR Green*”, preparada a partir de 1.350 μL de RT² SYBR Green 2X, 102 μL de cDNA y 1.248 μL de agua libre de RNasas; y la placa se centrifugó a 1.000 X *g* durante 1 min a temperatura ambiente. Seguidamente, la placa se introdujo en el termociclador iQ5 (BioRad) y la reacción de qPCR se realizó con el siguiente programa: 1 ciclo a 95 °C durante 10 min, 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y un ciclo final a 60 °C durante 1 min. Una vez finalizada la reacción, los datos correspondientes a los valores de Ct de cada gen, se exportaron a una hoja de datos para su posterior análisis.

Tabla 1. Genes de la vía de señalización del NF κ B humano analizados con el “RT² Profiler PCR array”.

VÍA DEL NF κ B
LIGANDOS Y RECEPTORES CD27 (TNFRSF7), CD40 (TNFRSF5), EGFR, F2R, FASLG (TNFSF6), IL10, IL1A, IL1B, IL1R1, IL8, LTBR, NOD1 (CARD4), TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF10, TNFSF14
INHIBIDORES BIRC2 (c-IAP2), FADD, IRAK1, IRAK2, IRF1, MYD88, RIPK1, TBK1, TICAM1 (TRIF), TICAM2, TNFAIP3, TRADD, TRAF2, TRAF3, TRAF6
SECUESTRADORES/LIBERADORES CITOPLASMÁTICOS DEL NFκB BCL3, CHUK (IKK α), IKKB, IKBE, IKBK, NFKBIA, NFKBIB (TRIP9), NFKBIE
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NFKB1, NFKB2, REL, RELA, RELB
GENES DE RESPUESTA AL NF κ B
RESPUESTA INMUNE CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), ICAM1, IFNA1, IFNG, IL8, LTA (TNFB), TNF
APOPTOSIS AGT, BCL2A1 (BCL-X), BCL2L1, BIRC3 (c-IAP1)
OTROS FACTORES DE SEÑALIZACIÓN POR EL NF κ B
QUINASAS AKT1, MAP3K1, RAF1
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ATF1, EGR1, ELK1, FOS, JUN, STAT1
OTROS GENES BCL10, CARD11, CASP1 (ICE), CASP8, CFLAR (CASPER), HMOX1, MALT1, PSIP1, RHOA, TIMP1

El análisis de la expresión génica diferencial, se realizó a través de la aplicación web que, para tal fin, ha desarrollado la casa comercial; basado en el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ y empleando 3 de los 5 genes constitutivos para la normalización de los datos. La

elección de los tres genes endógenos necesarios para llevar a cabo la normalización, se realizó comparando las medias aritméticas de los Cts de cada uno y en cada una de las condiciones (Control, EPS L y EPS P); para finalmente seleccionar aquellos genes con media más parecida y menor desviación estándar, eligiéndose la β -actina, la β -2-microglobulina y la proteína ribosomal P0. Se seleccionaron aquellos genes con un factor de cambio de expresión entre $\leq 0,5$ y/o $\geq 1,5$.

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Prism 5 (GraphPad). Los valores se sometieron al test de normalidad utilizando el test de Kolmogorov-Smirnow y, posteriormente, al test t de Student de doble cola para los datos pareados. Se consideraron significativos aquellos valores con $p < 0,05$.

2.7 Análisis funcional bioinformático

El análisis funcional de los genes seleccionados se realizó con la aplicación bioinformática DAVID 6.7, utilizando la información de términos de GO (CC, MF y BP) y de rutas moleculares (BBID, Biocarta y KEGG); así como los datos estadísticos de valor p y el valor de enriquecimiento, según el protocolo descrito en el apartado “Material y métodos” del capítulo 2 de este trabajo.

3. RESULTADOS

3.1 Pacientes y muestras

De todos los pacientes incluidos inicialmente, finalmente, se seleccionaron las muestras de 4 pacientes de EC, basándose la elección en la cantidad de tejido de colon obtenido durante la intervención (fig. 1).

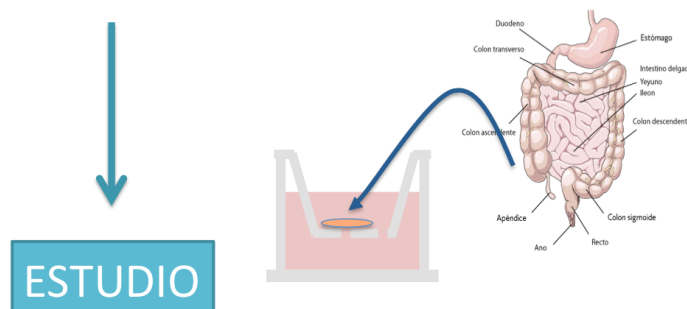
Al tratarse de pacientes, tanto las características de evolución de la enfermedad como de los tratamientos previos recibidos, fueron diferentes, confirmando la heterogeneidad de la propia enfermedad (tabla 2).

Pacientes incluidos

2 Colitis ulcerosa 7 Enfermedad de Crohn

CU: Recto (2 tejidos inflamados + 1 sano)

EC: Recto, Ileon, Colon, Ciego (6 tejidos inflamados + 2 sanos)



4 pacientes de EC (Colon y Ciego) con n = 8

Figura 1. Esquema de las muestras de mucosa intestinal inflamada obtenidas para el estudio. De las muestras de pacientes incluidas inicialmente, para el modelo *ex vivo* de inflamación intestinal, se seleccionaron aquellas de biopsia de tejido de colon.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con EC cuyos tejidos fueron utilizados para el modelo *ex vivo* de inflamación de la mucosa intestinal.

FRAGMENTO COLON	TIEMPO DE EVOLUCIÓN	SEGMENTO AFECTADO	TRATAMIENTO
Ciego	2 años	Ileo/cecal	Imurel
Ciego	< 6 meses	Ciego	Antibióticos
Colon derecho	8 años	Ileo/cecal	Imurel y Mesalacina
Ciego	28 años	Ileo/cecal	Imurel

3.2 Influencia de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados sobre los niveles de citoquinas en tejido intestinal

El material obtenido de las biopsias de los pacientes de EC, se incubó durante 4 h con el EPS L, el EPS P o la laminarina (a una concentración final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$); para, posteriormente, cuantificar los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α y IL-8) y anti-inflamatoria (IL-10) liberadas al medio por los tejidos, y así poder valorar el efecto de los tratamientos con los polímeros. La laminarina se empleó como control positivo dada su capacidad de activar el sistema inmune a través de su interacción con el receptor Dectin-1. (fig. 9 del capítulo 2) [207].

Como se puede observar en la figura 2, no se detectaron variaciones significativas en los niveles del TNF- α y de la IL-10, con los distintos tratamientos. En el caso del TNF- α , no se apreciaron diferencias, mientras que para la IL-10, el tratamiento con el EPS L y la laminarina, mostraron un ligero aumento de sus niveles, y en menor medida con el EPS P.

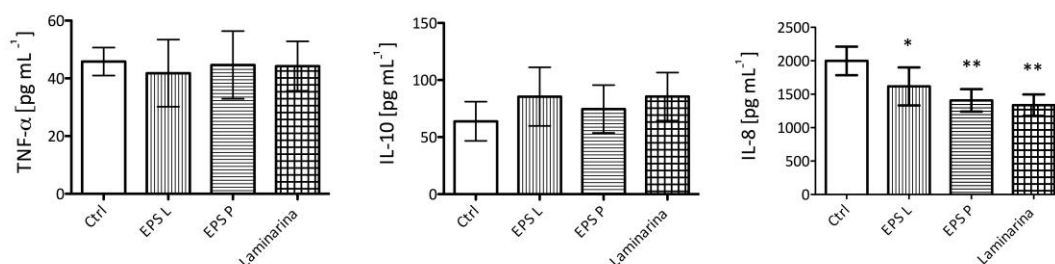


Figura 2. Efecto de los tratamientos con los (1-3)- β -D-glucanos en el modelo *ex vivo* de mucosa intestinal inflamada. Se cuantificaron los niveles de las citoquinas secretadas (TNF- α , IL-8 e IL-10) por los tejidos. Los niveles de TNF- α e IL-10 no se vieron afectados por los tratamientos, mientras que los niveles de IL-8 sí disminuyeron significativamente. * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado).

Sin embargo, los niveles de IL-8 sí se vieron afectados de manera significativa con todos los tratamientos, mostrando, en todos los casos, una reducción significativa de los niveles de esta citoquina ($p < 0,05$); siendo más marcada con los tratamientos con el EPS P o la laminarina.

3.3 Influencia de los (1-3)- β -D-glucanos ramificados en el perfil de expresión de genes inflamatorios en tejido intestinal

Una vez valorado, a nivel proteico, el efecto de los tratamientos de las muestras de biopsias con los β -glucanos, se evaluó la influencia de estos sobre los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, como las citoquinas TSLP, IL-8, IL-23p35 e IL-10, y el factor de transcripción NF κ B.

Los niveles de expresión de la IL-8 fueron más bajos en los tejido intestinal de pacientes de EC tratado con β -glucanos que en los no tratados, mientras que los niveles del mRNA que codifica la IL-10 se mostraron inalterados (fig. 3); confirmando los resultados obtenidos a nivel proteico (fig. 2). Atendiendo a los niveles de

expresión de los otros genes (no estudiados con anterioridad, pero con un papel destacado en la fisiopatología de la EC) (fig. 3), se observó la inhibición, a nivel transcripcional, de la expresión de la citoquina TLSP en los tratamientos con β -glucanos (principalmente con el EPS P), mientras que no se apreció variación alguna en la expresión de IL12p35. En el caso del transcrito que codifica el factor de transcripción NF κ B, sí que se observó un incremento en sus niveles, de aproximadamente 1,5 veces respecto al control, tras el tratamiento con el EPS L o la laminarina.

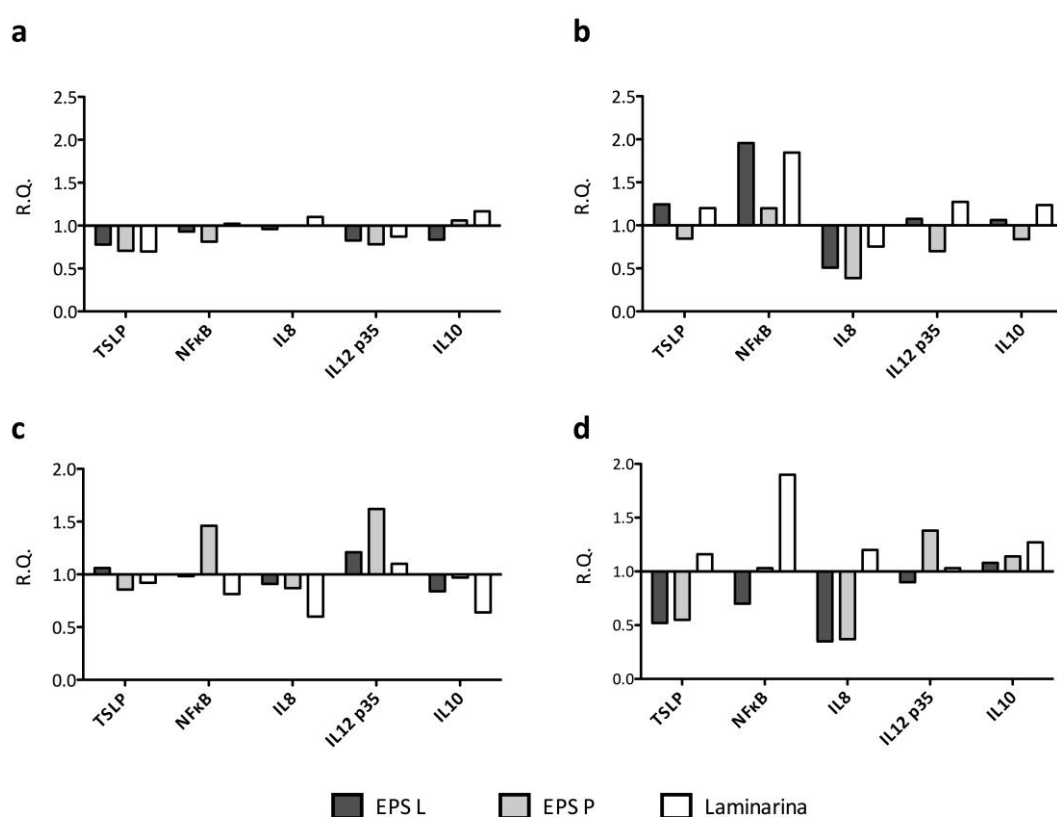


Figura 3. Efecto de los tratamientos con los (1-3)- β -D-glucanos sobre la expresión génica en el modelo *ex vivo* de mucosa intestinal inflamada. Muestras de distintos pacientes (a-d). Se analizaron los genes de inflamación TSLP, NF κ B, IL-8, IL-12 p35 e IL-10. Se observó que la expresión del transcrito del TSLP y la IL-8 se reprimía con todos los tratamientos, mientras que el NF κ B se sobre-expresaba en presencia del EPS L y la laminarina. La IL-10 no se vio afectada por ninguno de los tratamientos.

Globalmente, los resultados obtenidos indicaron una cierta tendencia hacia la reducción de la inflamación en las biopsias de EC tratadas con β -glucanos; aunque,

para ninguno de los genes estudiados, las diferencias en los niveles de expresión génica resultaron significativas respecto al control no tratado.

3.4 Influencia del EPS L y el EPS P en el perfil de expresión de genes pertenecientes a las vías reguladas por el factor transcripcional NFκB en tejido intestinal

Tras haberse demostrado la reducción de los niveles de IL-8, tanto a nivel proteico como a nivel transcripcional, así como la estimulación, en algunos casos, de la expresión del factor de transcripción NFκB, se decidió profundizar en el estudio de los efectos del tratamiento con β-glucanos sobre mecanismos moleculares y vías de señalización. Para ello, se utilizó un “array” de expresión génica para detectar genes implicados en vías de señalización asociadas al NFκB (que juega un papel importante en la regulación de la inflamación y la inmunidad). De esta forma, se utilizó el RNA procedente de uno de los pacientes de EC del modelo ex vivo (aquel que presentaba una mayor reducción de los niveles de IL-8), para estudiar el efecto de los EPSs sobre la transcripción de un total de 84 genes relacionados de algún modo con el NFκB.

El análisis de los niveles de los mRNAs, mostró un perfil diferencial de genes alterados en función del tratamiento proporcionado a los tejidos (tabla 3). En el tratamiento con el EPS L, se detectaron un total de 5 genes con una expresión inferior al control no tratado y 1 sólo gen afectado por la adición del EPS P. También, se observaron 10 y 19 genes con una expresión afectada por el tratamiento con el EPS L o con el EPS P, respectivamente. De entre los genes expresados diferencialmente, se encontraron 5 comunes a ambos tratamientos, que además mostraron el mismo comportamiento: IKBKE, PSIP1, RIPK1 y STAT1, activados, y CSF3, reprimido.

Tabla 3. Genes de vías de señalización del NFκB expresados diferencialmente por el tratamiento con los EPSs.
Se incluyen aquellos genes con un factor de inducción $\geq 1,5$.

	TRATAMIENTO			
	EPS L		EPS P	
	GENES	EXPRESIÓN ^a	GENES	EXPRESIÓN ^a
INHIBIDORES	HMOX1	0,45	CSF3	0,48
	CSF3	0,45		
	TNFSF10	0,50		
	IL1B	0,50		
	TIMP1	0,50		
ACTIVADORES	FOS	2,57	CCL2	2,67
	RIPK1	2,12	RIPK1	2,84
	PSIP1	2,08	PSIP1	1,57
	CCL5	2,06	MAP3K1	1,86
	STAT1	1,97	STAT1	1,79
	IKBKE	1,81	IKBKE	2,16
	BCL2A1	1,77	CSF1	1,79
	TLR6	1,74	IL1R1	1,72
	REL	1,52	BCL3	1,70
	NFKBIE	1,51	CD40	1,69
			TNFRSF10A	1,67
			BCL2L1	1,66
			RELB	1,60
			TRAF2	1,58
			IRF1	1,81
			NFKB2	1,57
			RAF1	1,52
			LTBR	1,52
			IRAK1	1,51

^a mostrado como proporción de frente al control no tratado.

3.5 Estudio funcional del efecto a nivel transcripcional de los EPSs sobre las vías reguladas por el NFκB en tejido intestinal

Con el objetivo de interpretar los resultados de la respuesta diferencial, que el tratamiento con EPSs produce en genes de vías de señalización del NFκB en tejidos de paciente de EC, se utilizó la herramienta bioinformática DAVID, con el fin de ordenar y extraer su significado biológico, gracias a la agrupación que realiza asociando genes de funciones y/o rutas comunes o relacionadas.

3.5.1 Agrupamiento funcional de los genes modulados por el tratamiento con el EPS L

Con el análisis del DAVID, se detectaron 3 agrupamientos representativos de los procesos/funciones que se vieron afectados por el tratamiento con el EPS L.

El primero de ellos, comprende los genes activados y reprimidos por el tratamiento (fig. 4), mostrando asociaciones para: TLR-6, HMOX1, REL, IL1B, TNFSF10, RIPK1 e IKBKE; con un valor de enriquecimiento de 5,41.

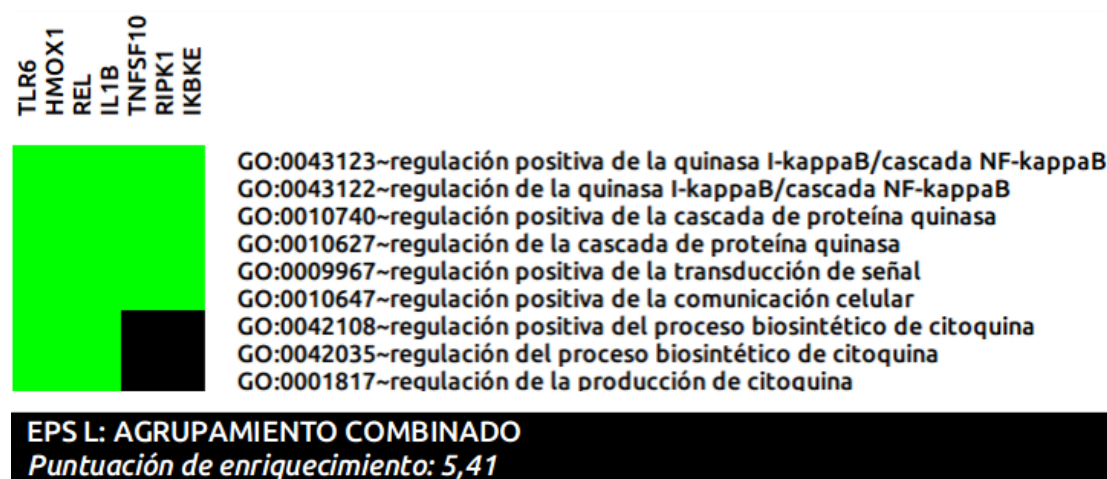


Figura 4. Agrupamiento funcional combinado de los genes con expresión alterada por el tratamiento con el EPS L. Se muestran los términos frente a los que se asocian significativamente ($p < 0,05$) los genes representados (tanto reprimidos como sobre-expresados por los tratamientos). El TLR6, HMOX1, REL e ILB1 se asocian con términos relacionados con citoquinas, mientras que los otros genes del agrupamiento no. El color verde indica la asociación positiva gen-término, mientras que el color negro indica que no hay referencias respecto a dicha asociación. El valor de enriquecimiento indica el grado en el que el agrupamiento está representado frente a la lista de todos los genes.

Estudiando en detalle los términos que agrupan estos genes, se comprobó que el enriquecimiento es mayor en procesos relacionados con la regulación de la cascada del NFkB y de la biosíntesis de citoquinas (tabla 4).

Tabla 4. Términos del agrupamiento combinado para el EPS L. Se presentan los términos estadísticamente significativos del agrupamiento ($p < 0,05$) con su valor de enriquecimiento. Todos los términos representados tienen un valor de enriquecimiento elevado.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0042108~regulación positiva del proceso biosintético de citoquina	75,15
GO:0043123~regulación positiva de la quinasa I-kappaB/cascada NF-kappaB	65,08
GO:0043122~regulación de la quinasa I-kappaB/cascada NF-kappaB	59,00
GO:0042035~regulación del proceso biosintético de citoquina	48,75
GO:0010740~regulación positiva de la cascada de proteína quinasa	37,80
GO:0010627~regulación de la cascada de proteína quinasa	25,35
GO:0009967~regulación positiva de la transducción de señal	21,40
GO:0001817~regulación de la producción de citoquina	19,93
GO:0010647~regulación positiva de la comunicación celular	19,19

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

El segundo agrupamiento, mostró un valor de enriquecimiento de 2,66, agrupando los genes sobre-expresados: FOS, CCL5, STAT1, TLR6, RIPK1 e IKBKE (fig. 5); en el que se destacan grupos funcionales relacionados con la respuesta inmune y con la inflamación, en respuesta a compuestos bacterianos (tabla 5).

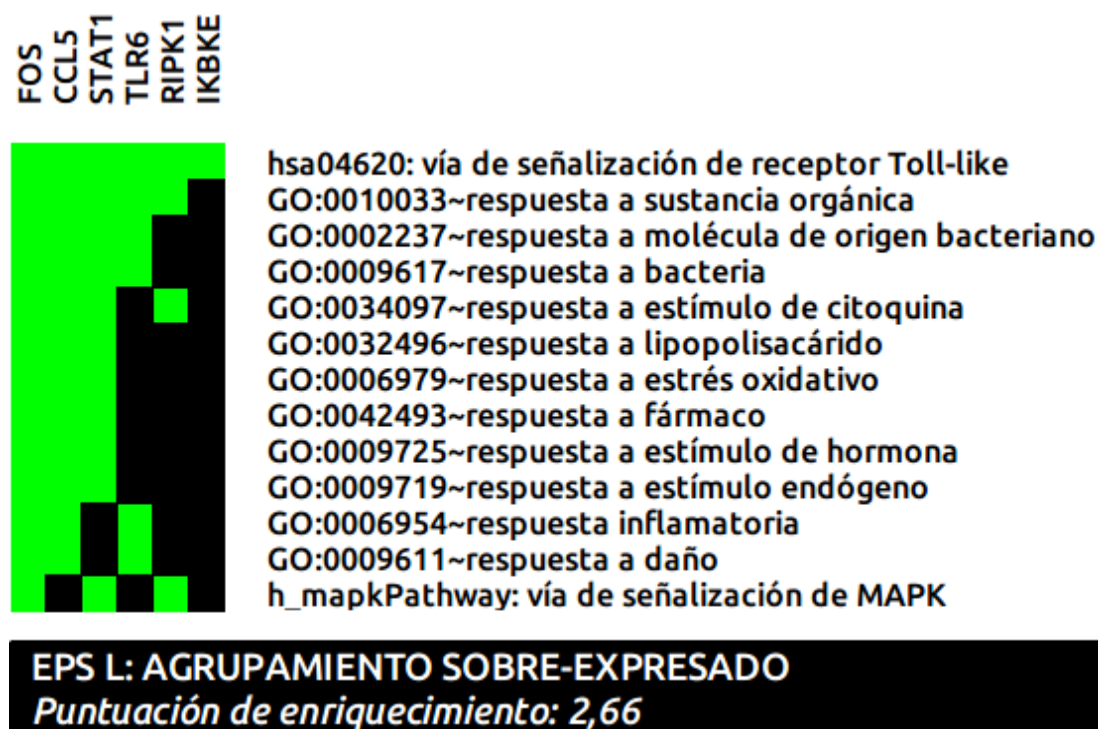


Figura 5. Agrupamiento funcional combinado de los genes sobre-expresados por el tratamiento con el EPS L. Se observó un subgrupo de genes formado por: STAT1, FOS y CCL5, que presenta asociación con términos relacionados con la respuesta celular a diferentes tipos de estímulos.

Tabla 5. Términos del agrupamiento de los genes activados por el EPS L. Destacan los términos relacionados con la respuesta a estímulos bacterianos y a citoquinas. También destaca el enriquecimiento de los genes agrupados en 2 rutas moleculares: señalización por TLR y señalización por MAPK.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0034097~respuesta a estímulo de citoquina	68,50
GO:0002237~respuesta a molécula de origen bacteriano	62,92
GO:0032496~respuesta a lipopolisacárido	52,71
hsa04620: vía de señalización de receptor Toll-like	43,15
GO:0009617~respuesta a bacteria	28,04
GO:0006979~respuesta a estrés oxidativo	24,75
GO:0042493~respuesta a fármaco	18,79
GO:0006954~respuesta inflamatoria	12,49
GO:0009725~respuesta a estímulo de hormona	11,06
h_mapkPathway: vía de señalización de MAPK	10,75
GO:0009719~respuesta a estímulo endógeno	10,02
GO:0010033~respuesta a sustancia orgánica	9,38
GO:0009611~respuesta a daño	7,66

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

El tercer agrupamiento estudiado incluyó los genes reprimidos por el tratamiento con EPS L: HMOX1, IL1B, TNFSF10 y CSF3 (fig. 6); con un valor de enriquecimiento de 2,66, y que se relacionó principalmente con citoquinas y con la respuesta inmune (tabla 6).

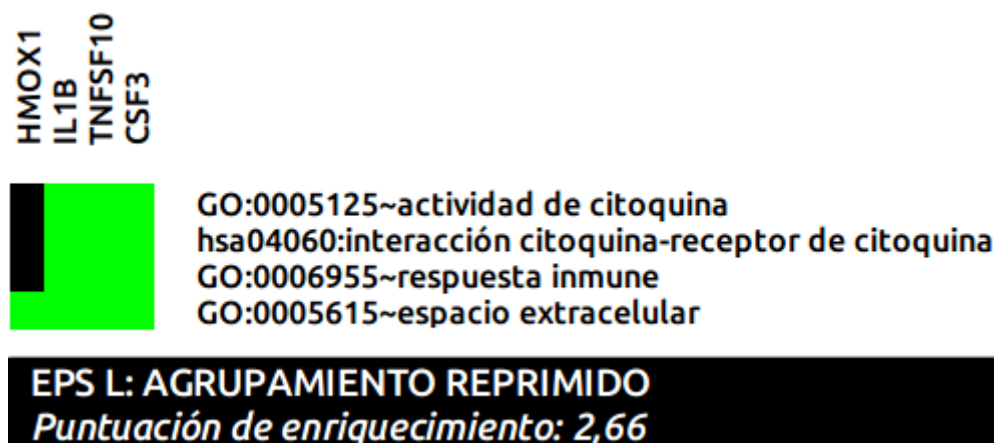


Figura 6. Agrupamiento funcional de los genes reprimidos por el tratamiento con el EPS L. Se observa un agrupamiento homogéneo, en el que sólo el gen HMOX1 muestra características diferenciales.

Tabla 6. Términos del agrupamiento de los genes reprimidos por el EPS L. El agrupamiento evidencia un enriquecimiento elevado en la actividad de citoquinas.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0005125~actividad de citoquina	39,95
GO:0005615~espacio extracelular	14,93
hsa04060:interacción citoquina-receptor de citoquina	14,56
GO:0006955~respuesta inmune	11,76

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

3.5.2 Agrupamiento funcional de los genes modulados por el tratamiento con el EPS P

El análisis funcional de los genes diferencialmente expresados, bajo el tratamiento con el EPS P, mostró 3 agrupamientos representativos de los mecanismos y rutas relacionados con el NFκB.

En el primero de ellos, se agruparon los genes activados: BCL2L1, STAT1, CCL2, BCL3, TNFRSF10A, RIPK1, IL1R1, TRAF2, MAP3K1 (fig. 7); con un valor de enriquecimiento

de 5,48, y en el que destaca el enriquecimiento en procesos relacionados con la cascada de proteínas quinasas y con la muerte celular (tabla 7).

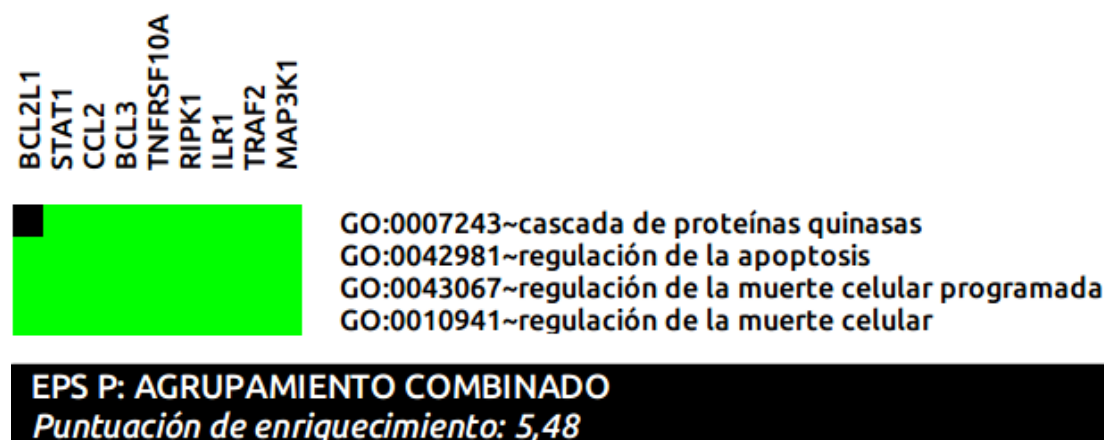


Figura 7. Agrupamiento funcional combinado de los genes expresados diferencialmente por el tratamiento con el EPS P. Se detectó un agrupamiento homogéneo de términos de muerte celular y cascada de quinasas, en el que sólo el gen BCL2L1 no presenta una asociación con este último término.

Tabla 7. Términos del agrupamiento combinado para el EPS P. El agrupamiento muestra un enriquecimiento superior en la cascada de quinasas, respecto a los términos de muerte celular.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0007243~cascada de proteínas quinasas	14,62
GO:0042981~regulación de la apoptosis	7,57
GO:0043067~regulación de la muerte celular programada	7,51
GO:0010941~regulación de la muerte celular	7,47

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

En un segundo agrupamiento con un valor de enriquecimiento de 4,30 se agruparon los genes sobre-expresados: NFκB2, IRF1, BCL3, RELB, y el gen reprimido: CSF3 (fig. 8). En este caso los términos indicaron la implicación en procesos relacionados con la regulación del sistema inmune, y en concreto con la hemopoyesis y la diferenciación de leucocitos (tabla 8).

El tercer y último agrupamiento, muestra un grupo reducido con sólo 3 miembros: BCL3, RELB1 e IRF1; con un valor de enriquecimiento de 2,74 (fig. 9). Al ser un grupo reducido, el enriquecimiento en los términos es mayor; de forma que, se encuentran valores muy elevados para procesos relacionados con la activación y diferenciación de las células T del sistema inmune (tabla 9).

NFKB2
IRF1
CSF1
CSF3
BCL3
RELB



GO:0002521~diferenciación de leucocitos
GO:0030097~hematopoyesis
GO:0002520~desarrollo del sistema inmune
GO:0048534~desarrollo de órganos linfoides o hematopoyéticos

EPS P: AGRUPAMIENTO COMBINADO

Puntuación de enriquecimiento: 4,30

Figura 8. Agrupamiento funcional combinado de los genes expresados diferencialmente por el tratamiento con el EPS P. Agrupamiento homogéneo, en el que sólo el NFKB2 no se asoció con la diferenciación de leucocitos y hematopoyesis; pero sí con el desarrollo del sistema inmune.

Tabla 8. Términos del agrupamiento combinado para el EPS P. Se muestra un enfoque del enriquecimiento de estos genes hacia mecanismos de diferenciación y desarrollo del sistema inmune y órganos linfoides.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0002521~diferenciación de leucocitos	25,81
GO:0048534~desarrollo de órganos linfoides o hematopoyéticos	15,61
GO:0002520~desarrollo del sistema inmune	14,70
GO:0030097~hematopoyesis	14,33

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

BCL3
RELB
IRF1



GO:0046632~diferenciación de células T alfa-beta
GO:0046631~activación de células T alfa-beta
GO:0030217~diferenciación de células T
GO:0030098~diferenciación de linfocitos
GO:0042110~activación de células T

EPS P: AGRUPAMIENTO COMBINADO

Puntuación de enriquecimiento: 2,74

Figura 9. Agrupamiento funcional combinado de los genes expresados diferencialmente por el tratamiento con el EPS P. Existe una homogeneidad en términos relacionados con la diferenciación de linfocitos T.

Tabla 9. Términos del agrupamiento combinado para el EPS P. Aunque el enriquecimiento para este grupo de genes está relacionado con la diferenciación de linfocitos T, destaca el muy elevado enriquecimiento en la activación alfa-beta de estas células.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a
GO:0046632~diferenciación de células T alfa-beta	144,94
GO:0046631~activación de células T alfa-beta	112,73
GO:0030217~diferenciación de células T	31,22
GO:0030098~diferenciación de linfocitos	19,70
GO:0042110~activación de células T	16,10

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

3.5.3 Enriquecimiento en términos de ontología génica para los genes modulados por el tratamiento con los EPSs

A partir de los términos para la función molecular de GO, se realizó el análisis de los genes cuya expresión resultó alterada por los tratamientos con los EPSs.

Para el EPS L, los genes se agruparon en sólo 2 categorías relacionadas con la actividad de citoquinas (tabla 10); mientras que para el EPS P se encontraron más términos de agrupación, destacando la regulación de la actividad de las caspasas y la actividad de las citoquinas (tabla 11). Estos resultados confirmaron los datos obtenidos del agrupamiento funcional (fig. 4 -9).

Tabla 10. Términos GO de función molecular para los genes diferencialmente expresados por el tratamiento con el EPS L. Se muestra la proporción de enriquecimiento de cada término y los genes asociados con el mismo. Existen sólo 2 términos que engloban parte de los genes afectados, y que están relacionados con la actividad de citoquinas.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a	GENES
GO:0032813~unión de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	64,43	TNFSF10, RIPK1
GO:0005125~actividad de citoquina	20,49	CSF3, TNFSF10, IL1B, CCL5

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

Tabla 11. Términos GO de función molecular para los genes diferencialmente expresados por el tratamiento con el EPS P. El enriquecimiento en términos funcionales para los genes afectados por el tratamiento con el EPS P, es mayor en su número, grado de enriquecimiento y número de miembros de cada categoría. En este caso destacan funciones relacionadas con actividad reguladora de caspasas y de citoquinas.

TÉRMINO	ENRIQUECIMIENTO ^a	GENES
GO:0043028~actividad reguladora de caspasa	47,12	TNFRSF10A, BCL2L1
GO:0005125~actividad de citoquina	10,51	CSF3, CCL2, CSF1
GO:0004674~actividad de proteína serina/treonina quinasa	7,94	IRAK1, IKKBE, MAP3K1, RIPK1, RAF1
GO:0004672~actividad de proteína quinasa	6,76	IRAK1, IKKBE, CCL2, MAP3K1, RIPK1, RAF1
GO:0008134~unión de factor de transcripción	5,33	TNFRSF10A, RELB, BCL3, NFKB2
GO:0019899~unión de enzima	5,23	CSF3, IRAK1, MAP3K1, CD40
GO:0042802~unión de proteína idéntica	4,27	IRAK1, MAP3K1, CSF1, BCL2L1
GO:0003700~actividad de factor de transcripción	3,50	RELB, IRF1, BCL3, NFKB2, STAT1
GO:0030528~actividad de regulador de la transcripción	2,71	IRAK1, RELB, IRF1, BCL3, NFKB2, STAT1

^a Enriquecimiento mostrado como proporción.

4. DISCUSIÓN

El uso de prebióticos y probióticos puede favorecer el restablecimiento de la composición adecuada de la microbiota del hospedador, cuando el estilo de vida, el estrés y los malos hábitos de nutrición alteran la composición de ésta [200]. Dicha microbiota sana, juega un papel importante en la homeostasis del intestino y en la regulación del sistema inmune, evitando la prevalencia de estirpes patógenas y ayudando a eliminar las infecciones. Por este motivo, diversos EPSs producidos por

bacterias probióticas, han sido investigados como nuevas fuentes de prebióticos [208]. Además, también se ha demostrado el papel beneficiosos de los β -glucanos activando el sistema inmune y mejorando, por tanto, las defensas del huésped frente a la inflamación [20], activando la respuesta inmune innata a través del reclutamiento de los macrófagos, y promoviendo la activación de los linfocitos y de las células NK [123].

En el presente capítulo, se utilizó el cultivo de tejido *ex vivo* (a partir de biopsias de pacientes de EC), como modelo de inflamación intestinal patológica, en la que, el sistema inmune, juega un papel muy importante en el desarrollo, propagación y mantenimiento de la inflamación; y por tanto de la enfermedad. Por consiguiente, este modelo, se mostró adecuado para estudiar los efectos de los tratamientos con los β -glucanos en el eje de la inmunidad intestinal. La utilización de la laminarina como control positivo de los tratamientos con el EPS L y el EPS P, se basó en trabajos previos que habían mostrado sus efectos beneficiosos sobre la mucosa intestinal: al provoca una reducción la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-1 β en cerdos [209], así como afectando la composición del mucus, el pH y la producción de ácidos grasos de cadena corta (como el butirato) en ratas [210].

En lo referente a la producción y secreción de citoquinas por el tejido intestinal, se demostró que los tratamientos con los EPSs y la laminarina fueron capaces de reducir significativamente los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-8, indicando un efecto en la reducción de la inflamación asociada a la mucosa epitelial del intestino. Por el contrario, no se observó una influencia significativa de ninguno de los (1-3)- β -D-glucanos sobre los niveles del TNF- α (pro-inflamatorio) y la IL-10 (anti-inflamatoria) (fig. 2). Esta falta de influencia podría ser debida a la corta vida media de estas citoquinas; posiblemente también afectada por la gran cantidad de proteasas que libera el tejido de los pacientes de EC [211]. Dicha hipótesis parece no factible en el caso de los resultados obtenidos para la IL-8, ya que los niveles detectados para esta citoquina fueron 40 veces superiores a los observados para el TNF- α y la IL-10. Por tanto, los valores obtenidos para IL-8 parecen ser reflejo de la situación biológica del tejido.

En cuanto al estudio de la regulación de la expresión génica (fig. 3), se observó un comportamiento similar entre los diferentes tratamientos (con cada uno de los EPSs o con la laminarina), con una reducción acusada de la expresión del TSLP (mediador epitelial de activación de las células T) y de la IL-8 (mediador epitelial de quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos); y un ligero aumento de la expresión de la IL-10 (anti-inflamatoria) y de la IL-12p35 (mediador inmune que promueve la diferenciación de linfocitos T a Th1) [197, 212]. Estos resultados, al igual que los obtenidos a nivel proteico, apoyan un efecto anti-inflamatorio de los (1-3)- β -glucanos a nivel de la mucosa intestinal, confirmando resultados previos con otros modelos [209, 210], incluidos los obtenidos en los capítulos 2 y 3 de este trabajo. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en la evaluación proteica, el efecto de la laminarina a nivel de expresión génica fue menor del esperado, y por debajo del efecto de los EPSs.

Dada la diferencia estructural de la laminarina (con ramificación *O*-6) respecto a los EPSs (con ramificación *O*-2), es posible que el reconocimiento celular de estos sea diferente o implique la activación de más de un receptor (además del Dectin-1, que une la laminarina), o bien que los mecanismos que activa, produzcan una mayor reducción de los niveles proteicos. Este hecho, resalta la importancia que las vías de señalización pueden tener a la hora de vehiculizar los efectos de una molécula o tratamiento dado. Por eso, teniendo en cuenta la importancia de las vías de señalización, y el desconocimiento de las mismas en el caso del EPS L y del EPS P, se realizó, en este capítulo, un estudio pormenorizado de las rutas moleculares en las que participa el NF κ B; detectándose una reducción de la IL-8 (tanto a nivel proteico como a nivel de expresión génica), y que su modulación tiene lugar a través de dicho factor de transcripción. Para ello, se seleccionaron las muestras del paciente de EC que presentaba los valores más reprimidos de IL-8, con el fin de estudiar los efectos de los EPSs en una situación de inflamación crónica.

Con el objeto de poder interpretar los resultados de expresión de los 84 genes relacionados con el NF κ B y darle un significado biológico, se seleccionaron aquellos genes que presentaban una alteración más marcada de sus niveles respecto al

control (factor de inducción $0,5 \leq y/\acute{o} \geq 1,5$). El análisis funcional con el DAVID, fue útil a la hora de destacar vías de señalización reguladas por los tratamientos con los EPSs.

Tal y como se había también demostrado con el análisis de términos, se observó un enriquecimiento en la vía de la apoptosis (mecanismo de muerte celular controlada implicada en la regulación de la homeostasis tisular, que consta de 2 vías principales: extrínseca, con Fas y otros miembros de la familia del TNFR y sus ligandos, e intrínseca, asociada a la mitocondria; que en conjunto activan la degradación proteica por caspasas) [213]. En el caso del tratamiento con el EPS L (que, globalmente, mostraba 15 genes alterados: 10 sobre-expresados y 5 reprimidos), se observó la reducción en la expresión de ligandos de muerte celular (TNFSF10 e IL-1B) y la sobre-expresión de una quinasa implicada en la necroptosis y en la supervivencia celular (RIPK1) [214]; afectando en conjunto estas proteínas a mecanismos dirigidos a reducir la inflamación y a la supervivencia celular (fig. 10a). Al tratar los tejidos con el EPS P (que alteró la expresión de un mayor número de genes: 20, estando sólo 1 de ellos reprimido) se detectaron más miembros involucrados en la ruta de la apoptosis: TNFRSF10A, RIPK1, TRAF2, IL1R1, IRAK1 y BCL2L1; todos ellos sobre-expresados y relacionados con supervivencia y muerte celular programada (fig. 10b).

El análisis funcional también permitió organizar los genes afectados por los tratamientos, en rutas de interacción de las citoquinas con sus receptores. Así, se observó que el EPS L afectó a la expresión de ligandos de las principales familias de citoquinas, mostrando: una reducción en miembros relacionados con citoquinas pro-inflamatorias como el TNFSF10 (ligando que induce la apoptosis) [215] y la IL1B (mediador importante de la respuesta inflamatoria, envuelto en actividades celulares como proliferación celular, diferenciación y apoptosis) [216]; una reducción de hematopoyetinas como el CSF3 (que estimula la producción de granulocitos, y también estimula la supervivencia, proliferación, diferenciación y función de neutrófilos) [217]; y un aumento de la expresión de quimioquinas como el CCL5 (mediador de reclutamiento de leucocitos a sitios de inflamación e inductor de proliferación de las células NK) [218]. En conjunto, estos datos parecen indicar una

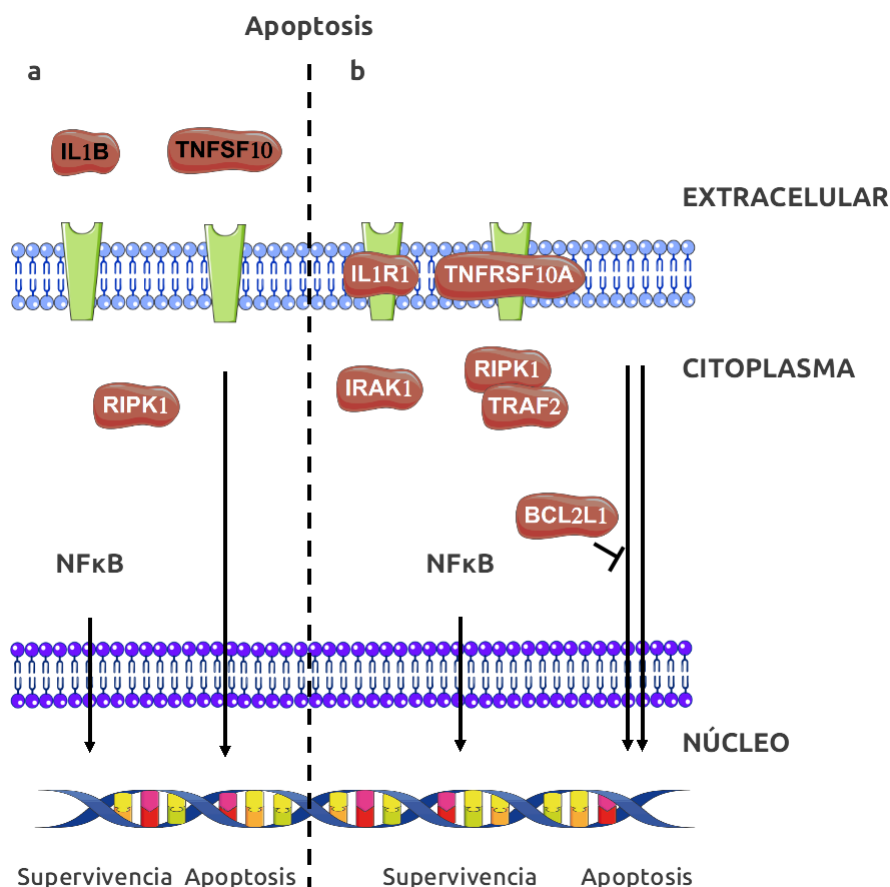


Figura 10. Efecto del tratamiento con el EPS L (a) o el EPS P (b) sobre la vía de señalización de la apoptosis. El tratamiento con el EPS L podría afectar la ruta apoptótica extrínseca (TNFSF10, IL1B), al tiempo que también podría activar rutas de supervivencia celular (RIPK1) a través de la vía del NFkB. El tratamiento con el EPS P podría activar los mecanismos de supervivencia celular a través de la alteración de la expresión de los genes TNFRSF10A, RIPK1/TRAFF2, IL1R1 e IRAK1, cuyos productos conducen directamente a la vía del NFkB. Por otro lado el incremento de BCL2L1, podría provocar una inhibición de la cascada intrínseca de la apoptosis. *Adaptado del (KEGG) [124].*

tendencia hacia la reducción de efectores inflamatorios, por la represión de los genes IL-1B y CSF3, a pesar de la estimulación del CCL5. Por el contrario, el tratamiento con el EPS P afectó a todos los grandes grupos de citoquinas y quimioquinas, pero principalmente a nivel de receptores; detectando una expresión diferencial de: sobre-expresión de la familia del TNF con el TNFRSF10A (receptor de TNFSF10, que promueve la activación de NFkB), el LTBR (receptor de la linfotóxina, con papel importante en el desarrollo y organización de tejido linfóide y en la liberación de quimioquinas) [219] y el CD40 una molécula de adhesión (receptor esencial en diversas respuestas inmunes e inflamatorias, relacionadas con células B y T) [220]; sobre-expresión del receptor IL1R1 (que media la activación dependiente de IL-1 del NFkB, MAPK y otras rutas como la vía de la p38) [216]; sobre-expresión de

la familia del PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), con la presencia del ligando CSF1 (factor de crecimiento hematopoyético envuelto en la proliferación, diferenciación y supervivencia de precursores hematopoyéticos, fagocitos como monocitos y macrófagos) [221]; sobre-expresión de quimioquinas como el ligando CCL2 (relacionado con el reclutamiento de monocitos, células T de memoria y células dendríticas a los lugares de inflamación) [222]; y por último se encontró reprimido un miembro de las hematopoyetinas, el CSF3 (factor que controla la producción, diferenciación y función de granulocitos). En conjunto, el análisis de estos genes muestra, de nuevo, un papel en la modulación de la inflamación y del sistema inmune intestinal, pudiendo apreciarse una posible disminución de la quimiotaxis de los neutrófilos hacia los focos de inflamación, gracias a la represión del gen CSF3, y la posible activación de la apoptosis, por la expresión de receptores de muerte celular como el TNFSF10A. Por otro lado, la sobre-expresión de los genes CCL2, CD40 y LTBR (que normalmente causan la activación reiterada del sistema inmune en la EC) no parece que fuese afectada por el tratamiento con el EPS P.

Una vía que destacó especialmente en el análisis integrado de los resultados de expresión génica, fue la de señalización por los TLRs (fig. 11) [223]; más aún, teniendo en cuenta las características de los tratamientos empleados y de los efectos buscados. En el tratamiento con el EPS L (fig.11a), se detectó activada la expresión de los genes: TLR6 (que participa en la respuesta innata inmune a bacterias Gram positivas y que puede interaccionar en sus respuestas con TLR2 y TLR4), RIPK1 (que transduce señales inflamatorias, de muerte celular y de supervivencia, a través de receptores de muerte celular y de la activación de los PRRs), FOS (que forma un complejo con JUN/AP-1 y que tiene un papel importante en la transducción de la señal y en la proliferación y diferenciación celular), CCL5 (que, como se ha comentado, está implicado en el reclutamiento de leucocitos y proliferación de células NK), IKBKE (que protege frente a muerte celular y participa en el balance energético, siendo capaz de mantener estados de baja inflamación), STAT1 (que transduce la señal de activación del IFN, propiciando un estado de protección y de estimulación de células T); y reprimida la expresión del IL1B (que como mediador pro-inflamatorio está implicado en la proliferación celular,

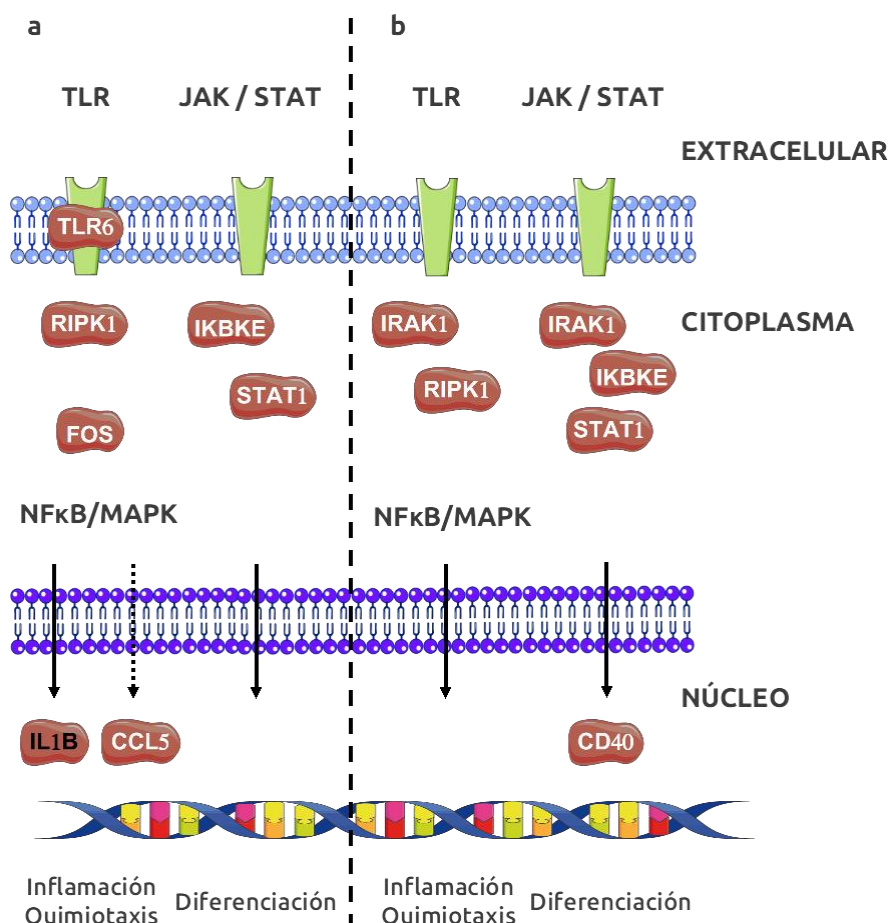


Figura 11. Efecto del tratamiento con el EPS L (a) y el EPS P (b) en la vía de señalización de los TLRs. El tratamiento con el EPS L provocó un incremento de la expresión de genes codificantes para el TLR6 y el RIPK1, y la represión de la transcripción de la IL1B, que participan en la ruta del MyD88 llevando a mecanismos de activación de la respuesta celular inmune, principalmente a través de la ruta de la MAPK; aunque también, podría estar activándose por el tratamiento la ruta independiente mediada por IKBKE y STAT1. El tratamiento con el EPS P ejerció sus efectos, principalmente, sobre la vía de señalización de los TLRs independiente de MyD88, como muestran su influencia sobre IRAK1, RIPK1, IKBKE, STAT1 y CD40, llevando presumiblemente, a la activación de la respuesta inmune a través de la estimulación de células T, CD y neutrófilos. *Adaptado del (KEGG) [124].*

diferenciación y, destacadamente, en la apoptosis). A pesar de que el CCL5 no parece ser una diana del tratamiento específico con el EPS L, y que su expresión favorece la diferenciación de las células T a Th1, la integración de todos los resultados en la vía de señalización de los TLRs, parece indicar que el tratamiento con dicho EPS conduciría a una reducción de la inflamación de los tejidos de EC; ya que, no solamente la expresión del gen de la IL-1B resulta reprimida (tabla 4), sino que la expresión en biopsias de pacientes de la IL-12p35 (fig. 3), la IL-1A y la IL-8 (resultados no mostrados), también presentó niveles inferiores a los detectados en el control no tratado. El tratamiento con el EPS P (fig. 11b), afectó a genes cuyos

productos están implicados en la vía de los TLRs. Sin embargo, el número de los genes modulados fue menor que el observado tras la administración del EPS L. Entre ellos 3 fueron afectados por ambos EPSs (RIPK1, IKBKE y STAT1), y 2 no habían sido detectados previamente (IRAK1, que activa tanto la vía de los TLRs como la vía del receptor IL1R, con respuestas pro-inflamatorias; y el CD40, relacionado con la estimulación de células B y T). Así, la sobre-expresión de estos genes indica un aumento de la inflamación que podría conducir a apoptosis, pero junto con la represión de la IL-12p35 (fig. 3), de la IL-1A y de la IL-1B (datos no mostrados), parece que globalmente podrían estar reduciéndose los niveles de la inflamación. Esta dualidad de los efectos del tratamiento con el EPS P, podría jugar a favor de la disminución de la tasa inflamatoria, porque por un lado estarían disminuyendo los mediadores de la inflamación y por otro estarían desapareciendo las células productoras de dicha inflamación por apoptosis. En el caso de la vía JAK/STAT, [224] que resultó activada tras el tratamiento con ambos EPSs, se asumió que no era una diana del tratamiento, ya que esta vía está íntimamente ligada a la retroalimentación del subtipo Th1; y que la producción del IFN- γ promueve la producción de la IL-12, que a su vez estimula la diferenciación de las células T.

Por último, se detectó otra vía de señalización destacada, pero en este caso con una mayor influencia en el caso del tratamiento con el EPS P (6 genes afectados). Esta vía fue la de la MAPK [225] y la expresión de los genes activados en ella fueron: IL1R1, TRAF2, MAP3K1, RAF1, RELB y NFKB2 (fig. 12). Esta activación podría provocar dos mecanismos de acción: uno a través del receptor IL1R, y otro a través de la familia de receptores de la vía clásica. En ambos casos, los mecanismos pueden degenerar a apoptosis, pero, también, a supervivencia y diferenciación; aunque, teniendo en cuenta que la expresión de los ligandos IL1B e IL1A del IL1R aparecía reprimida, es posible que dicha vía no se encuentre activada (fig.12). Atendiendo a la ruta clásica de la MAPK, la presencia de RelB parece indicar la activación de procesos anti-apoptóticos [226], dependientes de la señalización por el TNF- α ; si bien, existen estudios que demuestran que el RelB podría no unirse al DNA por la represión ejercida el RelA sobre-expresado, resultando en un programa transcripcional

diferente que llevaría a la apoptosis [227]. (En el presente trabajo de Tesis, la RelA se ha mostrado sobre-expresada, con un factor de inducción de 1,4.)

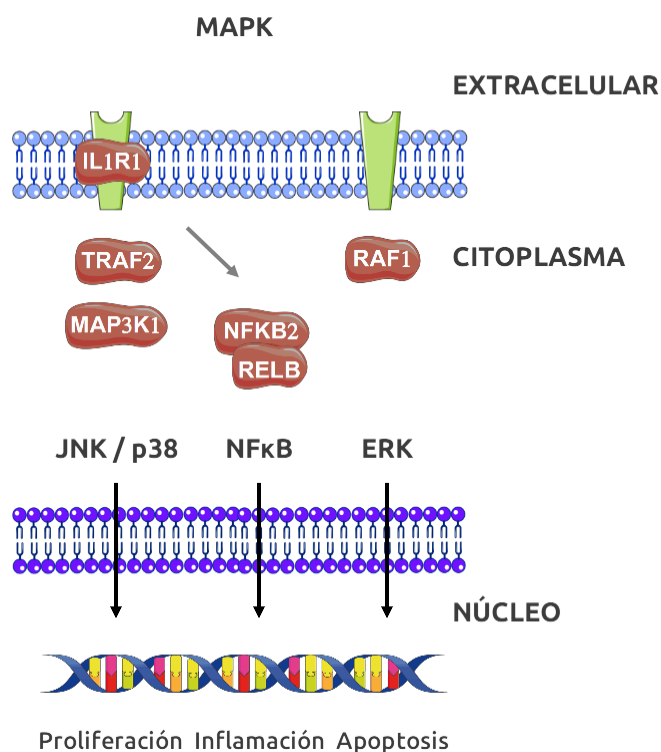


Figura 12. Efecto del tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos en la vía de señalización por MAPK. El tratamiento con el EPS P incrementó los niveles de IL1R1, MAP3K1 y TRAF2, que actúan sobre mecanismos de inflamación, proliferación y apoptosis, a través de JNK y p38. Asimismo, la activación de NFKB2 y RELB indicó también la implicación en procesos de proliferación celular, inflamación y anti-apoptosis, a través del NFkB; mientras que RAF1 en mecanismos de proliferación y diferenciación celular, a través de ERK. *Adaptado del (KEGG) [124].*

El análisis global funcional de los resultados del estudio del efecto de los tratamientos con los EPSs en tejidos de pacientes con EC, reveló una estimulación del sistema inmune, junto a una regulación de los procesos proliferativos, así como de la muerte inducida, en modo particular para el EPS P. Teniendo en cuenta los genes afectados, sus efectos parecen estar relacionados, concretamente, con la modulación de las células T, los macrófagos, las células NK, las CDs y los neutrófilos. Es importante, hacer hincapié en la naturaleza inflamatoria y proliferativa alterada de la EC, en que la activación de células T está descompensada hacia el subtipo Th1, frente al Th2, retroalimentando su propia producción; así como una inflamación continuada, además de haber una desregulación de la apoptosis en Th1 [212, 222, 228]. Pero, los resultados obtenidos en este trabajo con el modelo *ex vivo*, a nivel

génico y proteico, así como la interpretación biológica-funcional de los mismos, parecen indicar un efecto anti-inflamatorio de los EPSs, así como una inducción de la apoptosis, que podría facilitar la eliminación de los focos de inflamación que normalmente están presente en el tejido intestinal de los EC. Por un lado, el EPS L estaría disminuyendo la tasa inflamatoria, a través de mediadores como la IL-1A, la IL1B [216], la IL-12p35, la IL-8, el TNFSF10 y el CSF3 [222]; a la vez que promovería la supervivencia con IRAK1 [229] y la inflamación con FOS y CCL5 [157, 218]. Mientras, el EPS P estaría disminuyendo la diferenciación de los neutrófilos a través del CSF3 [222], disminuyendo la tasa inflamatoria a través de los mediadores IL-1A, IL1B, IL-12p35 y IL-8 [230], y activando la respuesta inflamatoria con IRAK1, así como la apoptosis con RelB, RelA [227]. En ambos casos, los EPSs no sólo estarían modulando las vías de señalización de células del sistema inmune, sino que estarían afectando a los otros tipos celulares presentes en el tejido.

Adicionalmente, cabe resaltar el hecho de que, los resultados han mostrado una situación en la que entre los mediadores de las vías del NFkB que se ven afectados por el tratamiento con el EPS P, hay mayor porcentaje de receptores respecto al tratamiento con el EPS L, en el que el porcentaje es mayor en ligandos/efectores. Este hecho, así como las demás diferencias de comportamiento de los tejidos frente a los tratamientos, podría ser debido a las características moleculares diferenciales que presentan estos EPSs. De esta forma, el EPS P posee una masa molecular ($9,6 \times 10^6$ Da) (fig. 3 del capítulo 1 de este trabajo y Werning et al., 2014) superior a la del EPS L ($6,6 \times 10^6$ Da) [65]; lo cual podría ser clave en el aumento de la afinidad del EPS P por su/s receptor/es, puesto que, la masa molecular y la estructura terciaria de los β -glucanos, juegan un papel crítico a la hora de la unión a sus receptores [98].

CAPÍTULO 5

**Los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2 bacterianos:
potenciales agentes antivirales e inmunomoduladores de salmónidos**

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se ha ido desarrollando históricamente como una actividad complementaria a la pesca. Sin embargo, debido al aumento de la población y la disminución en las capturas de la pesca extractiva, ha ido adquiriendo un interés creciente como fuente de recursos para la alimentación humana. En España la acuicultura es un sector industrial con grandes perspectivas de futuro debido a factores como, las características geográficas, las altas tasas de consumo de pescado y las crecientes dificultades para obtener productos de la pesca para el consumo humano.

Como seres vivos, los peces son susceptibles de padecer enfermedades infecciosas. Si bien, aunque las poblaciones naturales pueden verse afectada por agentes patógenos, en condiciones de cultivo donde los individuos están sujetos a factores estresantes (como monocultivo, espacio limitado, elevadas densidades de población y pobre calidad del agua) las alteraciones patológicas pueden ser problemáticas y convertirse en epizooticas. Dichas alteraciones pueden aumentar el riesgo de aparición de enfermedades que hasta el momento no habían sido descritas en poblaciones salvajes. De hecho, las pérdidas causadas por enfermedades infecciosas en acuicultura representan aproximadamente el 10% del coste total de la producción. Entre los patógenos de peces, los virus son los agentes más temidos, básicamente por la ausencia de herramientas eficaces para su prevención y tratamiento [231], como lo son los antibióticos para las bacterias.

En este contexto, el interés por los virus que afectan a peces teleósteos ha crecido en los últimos años debido a que la acuicultura se ha expandido, intensificado y diversificado en todo el mundo. Además, los movimientos de animales vivos o de sus productos han acelerado la dispersión accidental de enfermedades víricas en nuevas poblaciones y regiones geográficas. Uno de los virus que afecta a las poblaciones de salmónidos es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI). Este microorganismo fue el primer virus aislado de un pez en 1960, y se considera que es el virus acuático más ampliamente distribuido, infectando peces en Europa,

Norteamérica, Sudamérica y Asia [232]. El VNPI pertenece a la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus*, y es por tanto un virus sin cubierta, con RNA de doble cadena bisegmentado y con forma icosaédrica aproximadamente de 60 nm de diámetro [233, 234]. Clínicamente la enfermedad causada por el VNPI varía dependiendo del serotipo, etapa de cultivo y condición fisiológica de los peces, así como de las condiciones ambientales de las zonas de cultivo, tales como temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de cultivo [235]. En los salmónidos, el cuadro agudo de esta enfermedad ocurre entre el primer y el cuarto mes de cultivo, provocando en ocasiones una mortalidad acumulada del 10%. Por el contrario, en cultivos superiores a seis meses, la infección es subclínica o inaparente, no experimentando pérdidas significativas.

Para defenderse de éstas y otras infecciones, los peces disponen de un sistema inmunológico que es fisiológicamente similar al que poseen los vertebrados superiores, pero no es idéntico (fig. 1). A diferencia de los vertebrados superiores, los peces son organismos de vida libre desde la etapa embrionaria y dependen de su sistema inmune innato para la supervivencia [236]. La inmunidad innata, es un mecanismo de defensa fundamental en los peces, que desempeña un papel clave en la respuesta inmune adquirida y la homeostasis a través de un sistema de receptores. Estos receptores identifican los PAMPs típicos de microorganismos patógenos, incluyendo polisacáridos, LPS (lipopolisacárido), DNA bacteriano, peptidoglicanos, RNA viral y otras moléculas que normalmente no están en la superficie de los organismos multicelulares.

Los componentes de la respuesta innata están formados por las barreras físicas, constituidas por las escamas recubiertas de mucus enriquecidos en Igs, y por la respuesta inmune celular y humoral que incluye, los inhibidores de crecimiento, las enzimas líticas, las vías del complemento clásica, la vía alternativa, los anticuerpos, las citoquinas, las quimioquinas y los péptidos antibacterianos. Son varios los factores internos y externos que pueden influir en los parámetros de la respuesta inmune innata. Los cambios de temperatura, el manejo del estrés y la densidad poblacional pueden tener efectos supresores sobre este tipo de respuesta, mientras

que diversos aditivos alimentarios y los inmunoestimulantes pueden mejorar su eficiencia.

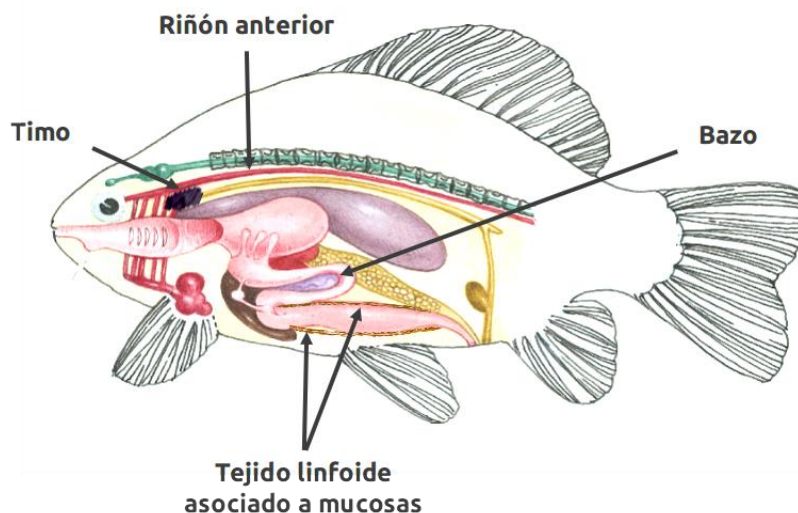


Figura 1. Sistema inmune en peces. El sistema inmune de los peces sólo incluye el timo, el bazo y el riñón, como órganos linfoides, y carece de médula ósea, a diferencia de los vertebrados.

Por otra parte, para el control de las enfermedades, las piscifactorías disponen de medidas sanitarias (destinadas a la detección de la presencia de enfermedades conocidas entre los peces), medidas higiénicas (como el empleo de desinfectantes en el medio acuoso), y por último medidas de control, siendo las vacunas y los compuestos antivirales las que tienen mayor potencial. La vacunación podría ser el método más eficaz para controlar el impacto de enfermedades. Sin embargo, para muchos de los virus más agresivos, las vacunas, tradicionales (vacunas atenuadas, muertas) o con antígenos virales, han resultado ser ineficaces. Además, en muchos países la utilización de las vacunas vivas no ha sido todavía aprobada debido a reglamentaciones de seguridad alimentaria. Una de las estrategias que se ha utilizado para mejorar las denominadas “vacunas de DNA” ha sido la inclusión de adyuvantes inmunoestimulantes en su preparación [237]. Estas vacunas, constituidas por vectores de expresión eucariotas que codifican proteínas, se inyectan directamente en las células y son capaces de expresar las proteínas de manera eficiente y con una correcta conformación; normalmente se trata de proteínas antigénicas de un patógeno [238]. Así, la vacunación con DNA

recombinante y adyuvantes ofrece muchas ventajas sobre los métodos convencionales de inmunización: son en teoría más seguras, es imposible que produzcan fenómenos de reversión, y además, son muy baratas y no tienen efectos adversos para los individuos [239]. Estas vacunas, mimetizan la infección viral mejor que otras vacunas, activando la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

En la actualidad, se ha reconocido la importancia de los adyuvantes como agentes anti-infectivos y han sido redefinidos como “un grupo de compuestos estructuralmente heterogéneos, que modulan la capacidad inmunogénica intrínseca de un antígeno” [240]. Los adyuvantes utilizados en acuicultura se pueden clasificar en dos grupos [241]. El primero incluye los complejos que vehiculan el antígeno, mientras el segundo incluye los compuestos conocidos como inmunoestimulantes, que determinan una respuesta inflamatoria de pequeña magnitud, favoreciendo la remisión de la patogénesis, gracias a la movilización de las células del sistema inmune hacia el patógeno. Entre éstos cabe destacar: los (1-3)- β -glucanos que estimulan una respuesta innata a través del receptor Dectin-1; las saponinas, compuestos vegetales naturales capaces de estimular la respuesta tanto vía Th1 como Th2; los lipopéptidos y los polinucleótidos (como el poli I:C), agonistas de los receptores TLR-3 [237]. Así en la actualidad, se está introduciendo el uso de productos inmunomoduladores (nucleótidos, glucanos y probióticos) en la producción acuícola, debido a que el uso de estos productos reduce la necesidad de tratamientos terapéuticos, mejora los efectos de las vacunas y a su vez, también mejora los indicadores de producción [242].

Debido a la incidencia de los brotes de las enfermedades víricas, el uso de nuevos preventivos como inmunoestimulantes para mejorar la respuesta innata de los peces y la resistencia frente a las enfermedades, está ganando cada vez más importancia en la acuicultura. En consecuencia, los (1-3)- β -D-glucanos con ramificaciones O-2 de origen bacteriano podrían ser agentes anti-infectivos en peces. Así, los objetivos del trabajo experimental descritos en este capítulo fueron, evaluar por una parte, la actividad anti-viral del EPS L y el EPS P frente al VNPI *in vitro* empleando la línea celular BF-2, y por otra, valorar los efectos inmunoestimulantes de dichos

polisacáridos, analizando su efecto *in vitro* en macrófagos aislados de riñón de trucha arco iris.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2

Los exopolisacáridos EPS P y EPS L, sintetizados respectivamente por *Pediococcus parvulus* 2.6 y por la bacteria recombinante *Lactococcus lactis* NZ9000[pGTF] (que expresa la GTF de la estirpe 2.6, responsable de la síntesis del EPS P), fueron producidos y purificados como se ha descrito en el capítulo 1 apartado 2.4 y 2.5 y en Notararigo *et al.* [144].

2.2 Cultivos de células de salmónidos y del virus de la necrosis pancreática infecciosa

2.2.1 Línea celular BF-2

Se utilizó la línea celular BF-2 (ATCC, CRL 1681) de *Lepomis macrochirus*; consistente en fibroblastos adherentes, obtenidos del tronco dorsal del pez. Las células se cultivaron a 25°C en medio de crecimiento L-15 de Leibovitz (Gibco), suplementado con 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 μ g mL⁻¹ de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y 10 % de FBS (Gibco). Para el mantenimiento de la monocapa celular, se empleó el mismo medio disminuyendo el porcentaje de FBS al 2 %.

2.2.2 Cultivo de macrófagos

A partir del riñón anterior de truchas arco iris, se aislaron macrófagos según el método previamente descrito [243].

Los órganos se aislaron asépticamente y se trituraron a través de una malla de nylon de 100 μ m de poro, utilizando medio L-15 suplementado con penicilina (100 U mL⁻¹), estreptomicina (100 μ g mL⁻¹), heparina (10 U mL⁻¹) y 2 % de FBS. La suspensión celular resultante se depositó sobre una solución de Percoll al 51 % (GE Healthcare) y los gradientes se centrifugaron a 500 x *g* durante 30 min a 4°C. La interfase celular, en la que se encontraban los leucocitos totales, se recogió con una pipeta, se transfirió a un nuevo tubo y se lavó dos veces con PBS 1X, centrifugando a 500 x *g* durante 5 min en medio L-15 suplementado con 0,1 % de FBS. Finalmente, tras

determinarse el número de células viables por exclusión con Trypan blue (Gibco), las células se resuspendieron a la concentración de 1×10^6 células mL^{-1} . El Trypan Blue es un colorante vital que tiñe selectivamente de azul las células muertas. En resumen, este procedimiento permite determinar la viabilidad celular como el número de células viables por el número total de células en el hematocitómetro. A la suspensión celular objeto de estudio se le añadió 0,1 mL de la solución stock de Trypan Blue (0,4 % en PBS, pH 7,2), para su análisis en conteo celular en el microscopio, siguiendo el protocolo comercial.

2.2.3 Propagación y mantenimiento del VNPI

Las células BF-2 fueron infectadas con el VNPI (procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo: ATCC VR1318) a las 24 horas de su siembra, cuando ya han formado una monocapa semiconfluente. Posteriormente se incubaron a 20°C hasta que los efectos citopáticos (ECP) producidos por el virus afectaron a toda la monocapa celular. A continuación se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a baja velocidad, (900 x g, 5 min) para eliminar los restos celulares, y la suspensión de virus resultante se repartió en alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

2.3 Ensayo de citotoxicidad

Se realizó determinando el efecto de los biopolímeros (EPS P y EPS L) sobre la viabilidad de los cultivos celulares de BF-2 mediante ensayos colorimétricos [244].

La monocapa confluyente de células BF-2 se cultivó en placas de 96 pocillos (Costar) y tras 24h de incubación, se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó por soluciones del EPS L o del EPS P disueltos en el medio de mantenimiento, en un rango de 100-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A los cultivos celulares controles se les añadió el mismo volumen de medio de mantenimiento sin EPSs. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 20°C durante 24 h, se retiró el medio y se tiñeron las monocapas durante 10 min con una solución al 1 % de cristal violeta disuelto en etanol al 96 %. Tras lavarlas una vez con PBS 1X y dejarlas secar al aire, se midió la Abs a 590 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad 680).

Los resultados se evaluaron calculando el porcentaje relativo de células supervivientes, respecto al 100 % que representa la absorbancia de las células control no tratadas.

2.4 Ensayos de actividad antiviral

La actividad antiviral de los EPSs se determinó ensayando la capacidad de éstos para inhibir los ECP (lisis celular) del virus sobre la monocapa de células BF-2. Dicha actividad se calculó como el porcentaje de células viables.

Brevemente, las células BF-2 (cultivadas en placas de 48 pocillos, aproximadamente $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) se infectaron a las 24 h de su siembra con el VNPI en presencia de concentraciones variables de (1-3)- β -glucanos ($100\text{-}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se utilizó un título vírico capaz de infectar al 50 % de las células del cultivo (TCID_{50}) de $1000 \text{ virus mL}^{-1}$. Las monocapas se incubaron a 15°C y fueron observadas diariamente al microscopio. Después de 72 h, cuando los ECP en las células control (infectadas y no tratadas) fueron totales (afectación de toda la monocapa celular), se determinó el porcentaje de células supervivientes mediante tinción con cristal violeta (como se ha detallado en el apartado 2.3 de este capítulo).

Para determinar el título infectivo del virus que se había multiplicado en presencia de diferentes dosis de los compuestos, se utilizaron como muestras las alícuotas de los sobrenadantes procedentes del ensayo de detección de actividad antiviral (descrito en el apartado 2.4 de este capítulo). Como controles se emplearon células no tratadas e infectadas (control virus), y células no tratadas y no infectadas (control células).

Para determinar los rendimientos del virus infectivo en las células BF-2, se realizó la titulación mediante la determinación del TCID_{50} . Para ello se utilizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes para infectar monocapas confluentes de células BF-2. Después de un periodo de incubación de 72 h a 15°C , se calculó el título infectivo determinando la dilución (decimal) más alta a la que el virus infecta el 50 % de las

células inoculadas. El título se expresa como recíproco de esta dilución, en unidades infectivas (TCID₅₀) por mL.

2.5 Análisis de la expresión génica en macrófagos

Los macrófagos de trucha arcoíris se cultivaron en frascos de 12,5 cm² (Falcon) (1 x 10⁶ células mL⁻¹) en el medio L-15 y se incubaron durante 24 h a 18°C. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionó L-15 suplementado con el EPS P o el EPS L en un rango de dosis de 100-1000 µg mL⁻¹, o con el inmunoestimulante poli I:C en un rango de dosis entre 25-100 µg mL⁻¹ (control positivo). El medio completo sin suplementar se utilizó para determinar los niveles basales sin estimular.

Al finalizar el experimento se recuperaron las células (por centrifugación y descartando el sobrenadante), para el posterior aislamiento de RNA con el kit de Trizol (Ambion) siguiendo las especificaciones del proveedor (descritas en el apartado 2.5 del capítulo 3). El RNA obtenido se resuspendió en agua libre de RNasas, se cuantificó con el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

Para llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real, en primer lugar las muestras de RNA se trataron con DNasa I para eliminar las trazas de DNA genómico que pudieran interferir en las posteriores reacciones. El tratamiento se llevó a cabo utilizando el kit RQ1 DNasa I libre de RNasas (Promega) y siguiendo las especificaciones de la casa comercial. El RNA se incubó durante 30 min a 37 °C con la DNasa I (1 U por µg de RNA) en tampón de reacción (1X). Al finalizar la incubación, la reacción se paró por la adición de una solución 20 mM de EGTA (pH 8.0) y posterior calentamiento a 65 °C durante 10 min. Estas muestras tratadas se utilizaron para llevar a cabo la síntesis del cDNA.

La RT-PCR se realizó con la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen), según el protocolo del proveedor. Las muestras de RNA procedente del tratamiento con DNasa I (12 µl) se incubaron, a 65 °C durante 5 min, con 1 µl de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg mL⁻¹) y 1 µl de una solución conteniendo los 4dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) cada

uno de ellos a una concentración de 10mM y se mantuvieron posteriormente 1 min a 4 °C. Seguidamente a cada muestra se añadió: 4 µl de tampón 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µl de DTT (0,1 M) y 200 U de la transcriptasa reversa, incubándose la mezcla de reacción durante 1 h a 50 °C. La reacción se detuvo calentando a 70 °C durante 15 min. El cDNA resultante se diluyó a la concentración deseada en agua ultrapura estéril, siendo conservado a -20 °C hasta su uso.

La evaluación de los niveles de transcripción de los genes IFN1 e IFN-γ se realizó mediante qPCR a tiempo real en un equipo Mx3005P™ qPCR (Stratagene), usando “SYBR Green PCR Core Reagents” (Applied Biosystems) y siguiendo el protocolo comercial. Así, 2,5 µl de cDNA se mezclaron con 5 µl de “SYBR Green PCR Core Reagents” y 2,5 µl de la mezcla de los dos cebadores (ver detalles en la tabla 1) a una concentración final de 0,125 µM para cada uno de ellos. Para la amplificación, esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de amplificación (30 s a 95 °C y 1 min a 60 °C) y un ciclo de disociación (30 s a 95 °C y 1 min a 60 °C). Todas las amplificaciones se realizaron por duplicado para confirmar los resultados, y se utilizaron controles negativos de todas las reacciones (pocillos conteniendo únicamente la mezcla de reacción sin cDNA).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de los niveles de expresión génica. Se muestra la secuencia de los cebadores utilizados para llevar a cabo la qPCR y sus correspondientes números de acceso del GenBank. Los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank utilizando el software OligoPerfect (Invitrogen).

Gen	Cebadores (5'-3')	N° de acceso
IFN1	F: AAAACTGTTTGATGGGAATATGAAA	AJ580911
	R: CGTTTCAGTCTCCTCTCAGGTT	
IFN-γ	F: GAAGGCTCTGTCCGAGTTCA	AJ616215
	R: TGTGTGATTTGAGCCTCTGG	

La expresión génica obtenida para cada gen (IFN1 o IFN-γ) se normalizó frente a los valores obtenidos para la expresión del gen endógeno EF-1α (factor de elongación 1α) en cada muestra. La alteración de los niveles de expresión se calculó usando el método del $2^{-\Delta Ct}$ (descrito en el apartado 2.7 del capítulo 3).

3. RESULTADOS

3.1 Efecto antiviral de los EPSs frente a la infección de fibroblastos por el VPNI

Como etapa previa a la valoración *in vitro* de la posible actividad antiviral del EPS L y del EPS P, se analizó un posible efecto negativo de los polímeros sobre la viabilidad de fibroblastos (línea celular BF-2) de peces. Su adición no provocó ningún efecto citotóxico sobre la monocapa celular constituida por las células BF-2, incluso a una concentración tan elevada como 1 mg mL^{-1} (resultados no mostrados).

Los posibles efectos antivirales de los β -glucanos se valoraron mediante el daño citopático ECP del virus de salmónidos VNPI en los cultivos de células BF-2 (en presencia o ausencia de dichos polisacáridos). Mientras que a través del porcentaje de supervivencia se determinó el nivel de protección frente al virus que cada polímero produjo a las concentraciones ensayadas.

El tratamiento con los EPS mostró un efecto antiviral, tanto para el EPS L como para el EPS P (fig. 2). El porcentaje ECP fue dosis-dependiente con ambos polisacáridos, de forma que el daño ECP fue desde destrucción total de la monocapa a bajas dosis ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) descendiendo gradualmente hasta que, a concentraciones de 1000 mg mL^{-1} , desaparecieron los ECP debidos a la infección vírica, siendo la supervivencia celular del 100 % (fig. 2). Estos resultados también mostraron que el TCID_{50} (título vírico capaz de infectar al 50 % de las células del cultivo) se alcanza a una concentración de $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos EPSs.

Además, se determinó la influencia de los polímeros en la replicación del virus en cultivos celulares, analizando su efecto en la producción viral. Se observó que a las dosis ensayadas, los dos (1-3)- β -D-glucanos fueron capaces de reducir el título viral, provocando a una concentración de los EPSs de $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, una reducción de cuatro unidades logarítmicas en el tamaño de la población viral generado por la infección (fig. 3).

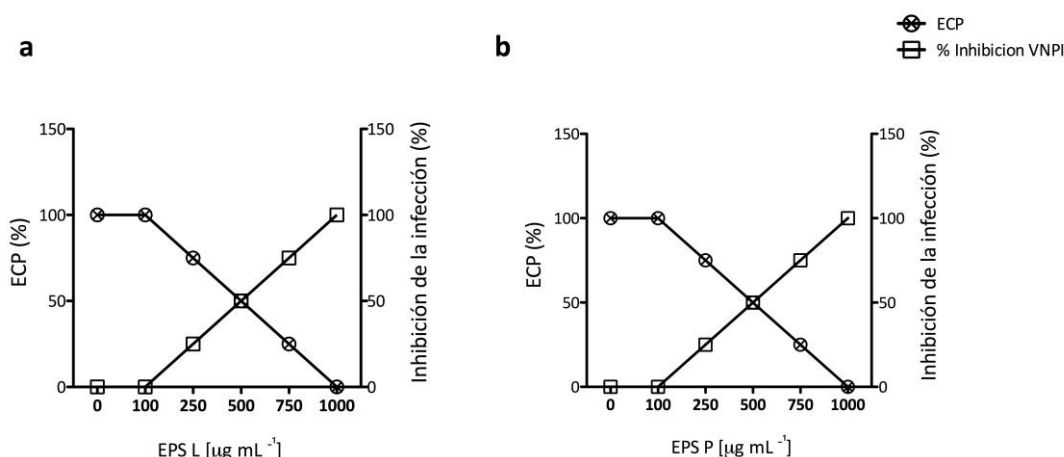


Figura 2. Actividad antiviral de los tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos frente al VNPI. Se observa como el efecto citopático, en células BF-2 infectadas, decrece a medida que aumenta la concentración de los EPSs en el medio; además, como respuesta a dosis crecientes de los polímeros se detectó un incremento del porcentaje de células supervivientes a la infección del virus. El 100% representa la carencia de ECP detectada en células control no infectadas y tratadas y el 0% corresponde a los ECP de las células infectadas y sin tratamiento.

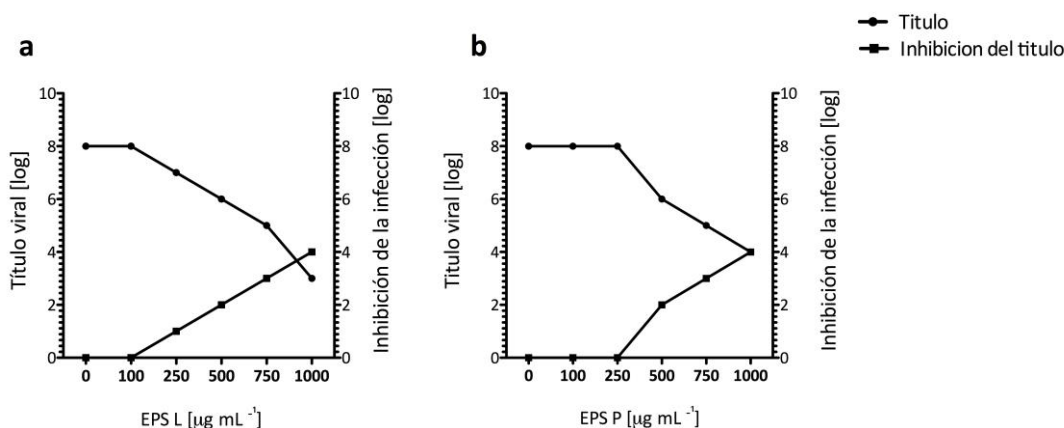


Figura 3. Influencia de los tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos en el título viral. Las monocapas de BF-2 infectadas con IPNV se trataron independientemente con diluciones seriadas de cada uno de los EPSs. El valor del título vírico indica la cantidad total de virus vivos presentes en el ensayo después del tratamiento; mientras que la inhibición del título indica la eficacia que ha tenido el tratamiento frente a la infección vírica. A las dosis ensayadas, los dos EPSs mostraron capacidad de inhibir el título viral de manera dosis-dependiente.

3.2 Efectos de los EPSs en la expresión génica de los interferones codificados por los macrófagos

Para investigar el potencial de los EPSs bacterianos como inmunoestimulantes, se aislaron macrófagos de riñón de trucha arcoíris y se evaluaron los niveles de citoquinas antivirales producidas por éstos, en respuesta a los tratamientos, tanto a nivel de respuesta inmune innata (IFN-1), como de respuesta inmune adaptativa

(IFN- γ). Como control positivo se utilizó el poli I:C, un inmunoestimulante constituido por una doble hélice de polirribonucleótidos que induce la producción de IFN-1 en muchas especies de peces teleósteos, reduciendo por tanto, las infecciones virales.

Los tratamientos de los macrófagos, tanto con el EPS P como con el EPS L, provocaron un incremento de los niveles de expresión del gen que codifica el IFN-1, siendo el EPS L el inmunoestimulador más eficiente (fig. 4a). La inducción de la transcripción del gen IFN-1 observada tras el tratamiento con ambos EPSs fue dosis-dependiente hasta el valor de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que a concentraciones superiores se detectaron con ambos polímeros una reducción de los niveles de expresión del interferón. Por otro lado, el control positivo poli I:C mostró un patrón de inducción similar al de los (1-3)- β -D-glucanos con sustituciones en posición O-2, pero a concentraciones inferiores, alcanzado su máximo efecto sobre la expresión del IFN-1 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 4a). Además, cabe destacar que a pesar de que la respuesta de los (1-3)- β -D-glucanos se obtuvo a concentraciones más elevadas, el máximo de inducción de la transcripción provocado por el EPS L a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (8 veces) fue casi el doble que el efecto atribuible al poli I:C en condiciones óptimas a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En lo referente al IFN- γ , los resultados obtenidos pusieron de manifiesto, que ambos (1-3)- β -D-glucanos inducían su expresión, siendo superior el efecto activador del EPS L (fig. 4b). Además, el patrón de influencia del EPS L y del EPS P sobre la transcripción de IFN- γ fue diferente (fig. 4b). Con el EPS L se detectó un perfil de inducción similar al observado sobre la expresión de IFN-1, con un efecto máximo del EPS L (incremento de 10 veces) a una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$; mientras que con el EPS P el efecto activador sobre la transcripción fue observado incluso a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (fig. 4b). Por el contrario, y como se esperaba, al no ser estimulador de la respuesta adaptativa, el tratamiento con poli I:C no provocó ningún efecto significativo en la expresión del IFN- γ (fig. 4b).

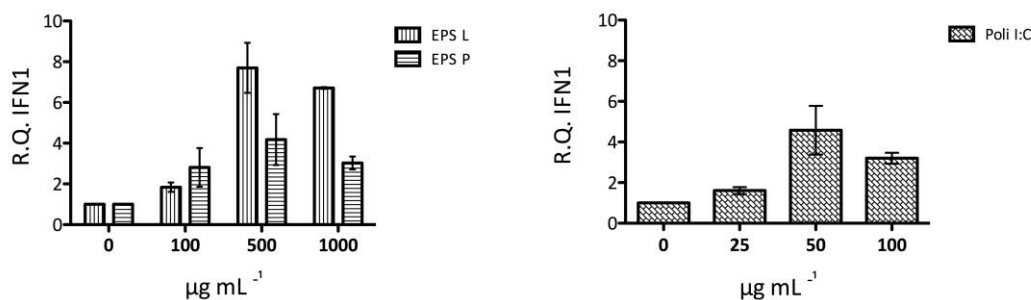
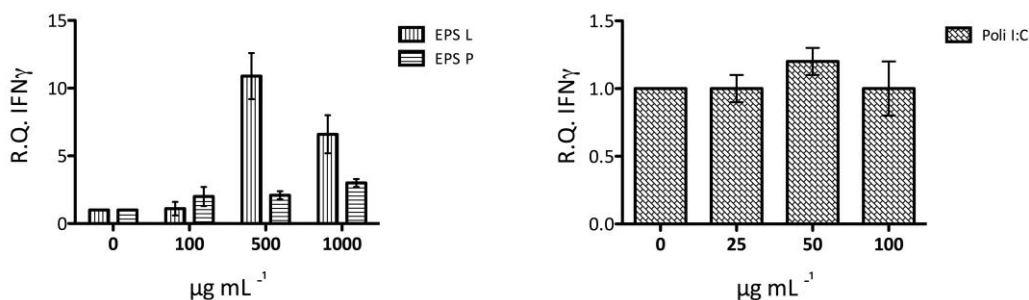
a**b**

Figura 4. Efecto de los tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos en la expresión génica en modelo *in vitro* de macrófagos. a) IFN-1, b) IFN-γ. La cuantificación relativa de los genes IFN-1 e IFN-γ reveló un comportamiento similar del EPS L para ambos genes; mientras que con concentraciones crecientes del EPS P, se obtuvo sólo una pequeña variación de la expresión del IFN-γ. El poli I:C ya que es un estímulo donde la respuesta inmune innata no afectó a la expresión del IFN-γ, y sí a la del IFN-1 (dosis-dependiente).

4. DISCUSIÓN

Ya que en las piscifactorías se utilizan medidas de control para disminuir el riesgo de contraer enfermedades infecciosas, [245] se han empezado a fabricar piensos que contienen (1-3)-β-glucanos producidos por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (MacroGard, Vetregard y EcoActiva), que incrementan la actividad del sistema inmune de los peces, generando una respuesta mucho más efectiva contra patógenos de diferentes orígenes [246].

Con estos antecedentes, en este trabajo se ha realizado por primera vez una incursión en el estudio de la actividad antiviral frente al VPNI, que presentan los (1-3)-β-D-glucanos bacterianos con ramificaciones O-2, utilizando un modelo *in vitro* de infección vírica de la línea celular BF2 de fibroblastos de *Lepomis macrochirus*.

Los resultados obtenidos, mostraron que el tratamiento con ambos EPSs inhibe el daño citopático en la monocapa celular (fig. 2) y reduce la infección por la disminución del título vírico (fig. 3). Estos resultados concuerdan con los previamente descritos, utilizando otros (1-3)- β -glucanos como inmunoestimulantes [245].

En los capítulos 2, 3 y 4 de este trabajo se ha descrito un efecto inmunomodulador del EPS L y del EPS P sobre células humanas, y que el gen STAT-1, involucrado en la señalización antiviral, se sobre-expresa en las muestras procedentes de pacientes tratadas con estos polímeros. Por ello, era factible que el efecto antiviral de los EPSs, detectado en este capítulo utilizando células de salmónidos, pudiera ser debido a un efecto inmunoestimulante. Sin embargo, en otros estudios, se ha descrito que algunos β -glucanos no provocan ni inmunoestimulación ni resistencia a patógenos [247, 248].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se procedió a evaluar el efecto del EPS P y del EPS L como inmunoestimulantes, utilizando como control positivo el poli I:C, un polinucleótido que confiere resistencia contra los virus por estimulación del IFN-1 [249]. Para ello, se realizó el estudio de la influencia de los EPSs en la expresión génica de macrófagos aislados de riñón de trucha arcoíris, específicamente sobre dos genes involucrados en la respuesta inmune innata (IFN-1) y adaptativa (IFN- γ). Los resultados obtenidos evidenciaron un incremento dosis-dependiente del IFN-1 provocado por el EPS L y el EPS P (fig.4a), confirmando que los (1-3)- β -D-glucanos con ramificaciones O-2, al igual que otros glucanos [250], activan la respuesta inmune innata. Por otra parte, los resultados obtenidos revelaron una estimulación significativa del IFN- γ provocada sólo por el EPS L (fig. 4b). Este resultado fue inesperado, ya que al poseer ambos EPSs la misma estructura y un elevado grado de pureza deberían producir el mismo efecto.

En los peces, los interferones participan en la respuesta de células infectadas por virus o bacterias. Así, el INF-1 desencadena la primera fase de la respuesta contra los virus a través de la producción de proteínas antivirales, mientras que el INF- γ

complementa la acción del IFN-1, participando tanto en procesos de inmunidad innata como de inmunidad adaptativa, aumentando la fagocitosis y la respiración oxidativa, y el número de moléculas de MHC I y II en macrófagos. Todo ello implica una mejor resolución de la patogénesis [249]. Sin embargo, IFN- γ es una citoquina, con menor actividad antiviral que el IFN-1 y es necesaria una concentración muy elevada para determinar una resistencia viral [249].

La producción de INF-1 es muy importante a la hora de inhibir la infección producida por el VPNI [249], de forma que los EPSs estarían jugando un papel crucial en su remisión. Además, el aumento de INF- γ provocado por el EPS L favorecería este proceso, determinando una respuesta más efectiva contra el virus.

En conclusión, el papel estimulador de la respuesta inmune innata observada para el EPS L y el EPS P, junto con su capacidad de reducir la actividad vírica en peces, podría sentar las bases para un futuro estudio de su uso como adyuvantes en vacunas para acuicultura. O bien, debido al bajo rendimiento de su síntesis por las bacterias productoras (aproximadamente 200 mg mL⁻¹), podrían utilizarse como componentes de alimentos funcionales (utilizando las cepas productoras, que sintetizan los EPSs *in situ*) con el mismo objetivo, reforzar el sistema inmune y prevenir infecciones víricas en piscifactorías.

DISCUSIÓN GENERAL

1. Introducción a la discusión general

Las BAL y las *Bifidobacterias* son utilizadas como probióticos para la elaboración de alimentos funcionales, sobre todo de productos lácteos. Además, las BAL son, primordialmente, utilizadas como cultivos iniciadores y coadyuvantes, debido a sus propiedades metabólicas. Además, la mayoría de las BAL y las *Bifidobacterias* comercializadas producen EPSs y, estos polímeros, actuando como bioespesantes, tienen un papel importante en las propiedades reológicas y textura de los productos lácteos [18]; efectos que reflejan las estructuras químicas de dichos EPSs, ya que en la naturaleza se presentan como lineales y ramificados.

Las BAL aisladas de bebidas alcohólicas, también son capaces de producir EPSs, como por ejemplo, el (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición *O*-2 (revisado en Werning et al., 2012) [33], cuya estructura es muy diferente a la de los glucanos aislados de hongos y levaduras (que poseen ramificaciones en posiciones *O*-4 y *O*-6) [110]. La peculiaridad de su estructura ha sido la razón por la que, recientemente, se han llevado a cabo diversos estudios sobre el potencial probiótico de sus bacterias productoras (revisado por Werning et al. 2012) [33], y del EPS de *P. parvulus* 2.6 como prebiótico, puesto que, todos los estudios previos sobre β -glucanos, se habían conducido en moléculas lineales β (1-3) o ramificadas con enlaces β (1-4) y β (1-6) [123]. Asimismo, el estudio del *P. parvulus* 2.6 (productor del (1-3)- β -D-glucano sustituido en posición *O*-2) y de la estirpe isogénica no productora, había mostrado que la presencia del EPS disminuía el efecto pro-inflamatorio ejercido por las BAL sobre los macrófagos humanos M1, indicando una posible actividad del polisacárido como inmunomodulador de la respuesta inmune innata [67].

Diversos estudios han demostrado que los (1-3)- β -glucanos lineales y ramificados en posición *O*-4 y *O*-6, aislados de cereales, hongos y levaduras, son capaces de regular la respuesta inflamatoria en diferentes tipos celulares (como células del sistema inmune, del epitelio intestinal y de la microglía de mamíferos), a través de su interacción con diversos receptores de membrana, expresados diferencialmente en dichas células [20, 156].

En base a estos antecedentes, en este trabajo se ha estudiado el efecto inmunomodulador de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2, producidos y secretados al medio extracelular por dos BAL: *P. parvulus* 2.6 (EPS P) y *L. lactis* NZ9000[pGTF] (EPS L); utilizando modelos *in vitro* de sistemas inmunes simples y de sistemas complejos (mucosa intestinal inflamada y biopsias de pacientes afectados de EC).

2. Purificación de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2

Para estudiar, desde un punto de vista inmunológico los β -glucanos EPS P y EPS L, en este trabajo se quiso minimizar, durante su producción y purificación, la presencia de eventuales contaminantes en el producto final liofilizado. Los receptores de membrana son capaces de reconocer pequeñas dosis de ligando, por lo que, para estudiar el potencial inmunomodulador de los EPSs, era imprescindible poner a punto un protocolo de aislamiento y purificación, que permitiese obtener un producto final puro. De esta manera y con el fin de poder estudiar, también, las características moleculares de los EPSs, se eligieron condiciones de crecimiento de máxima producción con mínima contaminación, de manera que los componentes del medio no interfiriesen con el posterior análisis; teniendo en cuenta, además, que para que las características de un determinado EPS sean prácticamente idénticas en distintas preparaciones del polímero (en términos de composición, conformación y masa molecular), es necesario mantener las mismas condiciones de crecimiento de la bacteria productora [251].

Así, como se ha descrito en el capítulo 1, en este trabajo se utilizaron medios preparados por componentes con alto grado de pureza (MST para *P. parvulus* y CDM para *L. lactis*) y carentes de componentes como peptona o extractos de carne y levadura, que contienen ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos, para el crecimiento de ambas bacterias. Además, se utilizó glucosa en ambos medios de cultivo, ya que se había descrito, previamente, que era la fuente de carbono adecuada para la producción óptima de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición *O*-2 [134]; y la temperatura de crecimiento fue de 30 °C, en ambos casos. Con el fin de minimizar la contaminación de los medios de cultivo por componentes

bacterianos, debidos a lisis celular (como DNA, RNA, proteínas y paredes celulares conteniendo polisacáridos), se utilizaron los siguientes protocolos: *P. parvulus* 2.6 fue crecido durante 96 h en un quimiostato (ver capítulo 1 y Notararigo et al. 2013) [144] y *L. lactis* NZ9000[pGTF] fue crecido en cultivo no continuo durante 24 h, después de inducir la expresión heteroespecífica de la enzima GTF glicosiltransferasa de la estirpe 2.6, y consecuentemente la síntesis y secreción del EPS con nisina, (como se indica en el capítulo 1 y en Werning et al. 2008) [36].

Por otra parte, el aislamiento y la purificación de los EPS, a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, requieren la manipulación de los mismos. El método más sencillo conlleva su diálisis frente a agua, seguida de liofilización; procedimiento utilizado para aislar el EPS de *Lc. lactis* spp. *cremoris* [252]. Pero también, es posible concentrar la muestra por precipitación con etanol antes de dializar, como en el caso de los polímeros de BAL termófilas y mesófilas [64]. Sin embargo, cuando la complejidad del medio es muy elevada, es necesario aumentar el número de precipitaciones para disminuir el contenido en proteínas de la preparación final de EPS. Así, en el caso específico de los EPSs obtenidos a partir de medios de cultivo conteniendo leche, se suele utilizar ácido tricloroacético a una concentración final entre el 4-14 % [253]. En los protocolos utilizados en este trabajo, y descritos en el capítulo 1, los sobrenadantes de los cultivos se concentraron y precipitaron con tres volúmenes de etanol absoluto (para eliminar la fuente de carbono añadida al medio), y después con dos ciclos de re-precipitación con etanol para eliminar eventuales contaminantes. Otros autores han utilizado técnicas de filtración con membranas (como la microfiltración) para purificar EPSs [254], de forma que, sería posible fraccionar las moléculas de EPS en función de su masa molecular, dependiendo del tamaño de los poros de los filtros empleados. En el presente trabajo de Tesis, este método no se consideró el más adecuado, por causa de la masa molecular tan elevada que presentaban, y porque sólo se detectó una especie molecular (tanto para el EPS P como para el EPS L) (fig. 2 del capítulo 1). Otra técnica implica el uso de columnas cromatográficas para aumentar el grado de pureza [255]. En este caso, para purificar el EPS P y el EPS L, se utilizó una columna cromatográfica de exclusión molecular (columna de Sepharose CL-6B) equilibrada

con NaOH 0,3 M, para eliminar completamente los restos de los contaminantes, para lo que, los EPSs se disolvieron en el mismo tampón y, tras el pase en la columna, se dializaron y liofilizaron.

El posterior análisis de los EPSs purificados, mediante la determinación de su espectro de infrarrojos (fig. 3 del capítulo 1) y su análisis por metilación (fig. 4 del capítulo 1), confirmó que se habían obtenido preparaciones de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2, sin contaminación con otros polisacáridos y sintetizados por la misma GTF glicosiltransferasa, utilizando como hospedador dos BAL pertenecientes a géneros diferentes.

Hasta la realización del presente trabajo, la mayoría de los estudios encaminados a evaluar el papel inmunomodulador de otros β -glucanos, se habían desarrollado utilizando preparaciones obtenidas a través de una precipitación con etanol del sobrenadante del cultivo, [256, 257], sin asegurarse de que el liofilizado estuviese libre de contaminantes. En el caso de las preparaciones aquí obtenidas, la determinación de la concentración de moléculas de glucosa (por el método del fenol sulfúrico) [137], y de los niveles de DNA, RNA y proteínas (valorados utilizando la tecnología Qubit de cuantificación fluorimétrica) [144], en los distintos estadios de obtención y purificación, demostró la eficiencia de la purificación y la inexistencia de trazas detectables de los posibles contaminantes analizados en los liofilizados purificados (tabla 1 del capítulo 1).

3. Vías de señalización afectadas por el tratamiento con los (1-3)- β -D-glucanos

Para entender la función inmunomoduladora de los EPSs estudiados en este trabajo de Tesis, se han investigado, a nivel intracelular, los mecanismos que estos desencadenan, mediante estudios de señalización que se realizaron en macrófagos humanos (capítulo 2) y en biopsias de pacientes afectados de la EC (capítulo 4). En el primer caso, estudiando su efecto en el perfil de proteínas fosforiladas y, en el segundo, determinando su influencia en el perfil de expresión de genes involucrados en las vías reguladas por el factor transcripcional NF κ B.

En los macrófagos, se realizó un estudio comparativo de los tratamientos con cada uno de los dos EPSs y con el LPS de *E. coli*, para evidenciar las diferencias de la respuesta inmune innata frente a un (1-3)- β -D-glucano (componente extracelular de bacterias Gram-positivas beneficiosas) respecto a un LPS (componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas patógenas). Todos los tratamientos provocaron cambios en los perfiles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en macrófagos derivados de monocitos M1 (fig. 8 del capítulo 2), y en macrófagos PMA-THP-1 (fig. 8 del capítulo 2 y fig. 10 del capítulo 3). Además, aparentemente, los EPSs fueron capaces de activar vías de señalización distintas a las afectadas por el LPS; identificándose, específicamente, tres vías de señalización: una de ellas controlada por la serina/treonina quinasa mTor [168, 169], otra en la que está implicada el receptor ErbB de factores de crecimiento [258], y la vía de uniones adherentes [170]; indicando que los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2 activan procesos de diferenciación, migración, proliferación y supervivencia celular (fig. 16 del capítulo 2). Esta respuesta al tratamiento con los EPS es diametralmente opuesta a las vías de la proteína quinasa MAPK (como ERK1/2, JNK y p38) [157], que son estimuladas por el LPS y que conducen a la muerte celular programada. Cabe resaltar, que otros autores, utilizando macrófagos de líneas celulares de diferentes orígenes o bien macrófagos humanos, encontraron otros patrones de respuesta celular frente a β -glucanos de diferentes orígenes y estructuras. En un estudio *in vitro*, Chang *et al.* (2009) demostraron que macrófagos procedentes de la línea celular de rata RAW264.7, se estimulaban tras el tratamiento con un β -glucano aislado de *Paenibacillus polymyxa* JB115, que su actividad aumentaba los niveles de NF κ B y de AP1(Fos), y que, a la vez, los niveles de fosforilación intracelular de ERK1/2, JNK y p38 eran elevados, confirmando que la vía de señalización utilizada por este polisacárido era la MAPK [259]. Otro estudio realizado, utilizando diferentes líneas celulares de rata y humanas (RAW264.7, Mono Mac 6 y THP-1), demostró que el efecto del β -glucano aislado de *Aureobasidium pullulans* aumentaba la expresión de TRAIL, una citoquina que induce apoptosis en células cancerígenas [260]. Además, en otros estudios donde se utilizaron macrófagos RAW264.7 y macrófagos aislados de monocitos humanos, se confirmaron los efectos inmunomoduladores que un β -glucano sintético (con la misma estructura que el lentiniiano, un (1-3)- β -glucano

sustituido en posición *O*-6) tenía sobre el sistema inmune; de manera que, en los macrófagos de ratón se activó el ERK y se suprimió la vía de la AKT, mientras que en macrófagos humanos aumentó la secreción de numerosas citoquinas y quimioquinas, como la IL-1 β , la IL-23, la IL-17 y el CCL5 o RANTES, demostrando su actividad sobre la inmunidad innata [261].

Estos resultados sugieren que la estructura primaria, el peso molecular y la estructura terciaria son la causa determinante de las diferentes respuestas descritas, del mismo modo que el número de receptores involucrados y, evidentemente, el modelo elegido [125]. En el caso de los (1-3)- β -D-glucanos con sustituciones en posición *O*-2, se desconoce su receptor y, en este trabajo, no se detectó un reconocimiento de los EPSs por parte del receptor Dectin-1 (en hibridomas), que sí se observó para el zymosan (paredes de *S. cerevisiae*, que contienen (1-3)- β -D-glucanos) y la laminarina (de *L. digitata*, con sustituciones en posición *O*-6) (fig. 10 del capítulo 2).

En el caso de los experimentos realizados utilizando biopsias de pacientes afectados por la EC (capítulo 4), los estudios transcripcionales pusieron de manifiesto que el tratamiento con los EPSs fue responsable de una expresión diferencial de parte de los 84 genes incluidos en el análisis: 10 genes sobre-expresados y 5 genes reprimidos en presencia del EPS L, y 19 genes sobre-expresados y 1 reprimido tras exposición al EPS P (tabla 2 del capítulo 4). El análisis funcional de estos resultados, permitió observar cómo el tratamiento con los EPSs de BAL promovía la activación de vías como MAPK, TLR y apoptosis. Pero, además, dichos resultados tienen que considerarse en el contexto de la regulación de la expresión génica en la EC, en la que numerosos procesos biológicos están desregulados: como la resistencia de las células T a la apoptosis, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células presentadora de antígenos (la IL-12, el INF- γ y la IL-18); que conlleva a un aumento del subtipo Th1 en comparación con el subtipo Th2 [212]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se seleccionaron grupos de genes (entre los que mostraron alteraciones de expresión tras el tratamiento con los EPSs) para intentar establecer una correlación con el mecanismo de acción de los biopolímeros. En

concreto 5 genes para el EPS L: RIPK1, CCL5, STAT-1, IKBKE, CSF3; y 5 genes para el EPS P: RIPK1, CCL2, STAT-1, IKBKE, CSF3.

Recientemente, se ha demostrado que el producto del gen RIPK1 (cuyo transcrito mostró una sobre-expresión, tras la exposición de las células a cada uno de los dos EPSs) es capaz de mantener un balance entre la renovación y la muerte celular de las células intestinales (función muy delicada que desempeña el intestino en condiciones normales); cuya ausencia determina una susceptibilidad a contraer colitis en ratones, y que se ve alterada en la EC. Así, los resultados obtenidos podrían significar que el incremento de la proteína RIPK1 tras el tratamiento con los polímeros, favorecería la reparación del lumen intestinal [214, 229].

Del mismo modo, la expresión del CSF3 fue reprimida en presencia del EPS L y del EPS P, hecho que podría implicar un bloqueo del proceso de diferenciación de los granulocitos o neutrófilos (cuando normalmente esta clase de células son muy elevadas debido a la desregulación del propio sistema inmune en individuos con la EC)[222].

STAT-1 y IKBKE están relacionados, y forman parte de la misma vía de señalización. En la EC los niveles de STAT-1 están alterados, porque aumenta la transcripción del gen del IFN- γ , retroalimentando la producción del subtipo celular Th1. Sin embargo, esta proteína también se considera esencial en la maduración de las CDs y se expresa en el subtipo Th2. Por este motivo, los resultados obtenidos no permiten discriminar si los (1-3)- β -D-glucanos son capaces de modular el balance Th1/Th2 para restablecer las condiciones normales. Otro aspecto que hay que tener en cuenta en el análisis de los resultados obtenidos, es que el IKBKE podría tener un efecto inhibitor sobre STAT-1, disminuyendo la tasa inflamatoria. Un resultado que podría estar a favor de esta hipótesis, es la escasa expresión de la IL-12p35 que se observó en los pacientes objeto de estudio (fig. 3 del capítulo 4) [262].

Por otra parte, CCL2 es una quimioquina que aumenta la migración de las células T hacia los focos de inflamación [263], y su expresión, se incrementó por acción del EPS P y se reprimió tras el tratamiento con el EPS L (resultados no mostrado). En un

estudio *in vivo* con un modelo de colitis en ratones BALB ("*Bagg Albino*"), se ha demostrado que la utilización de CCL2, a concentraciones subfisiológicas (60-120 ng), minimiza los síntomas de la colitis tras el tratamiento intraperitoneal, inhibiendo la migración de las células T hacia los focos; lo que sugiere que, el EPS P, podría promover un efecto parecido si la concentración de la proteína fuese muy baja [263]. Sin embargo, es de esperar que el tratamiento con el EPS L debería reducir la quimiotaxis hacia los focos de inflamación, ya que la expresión del CCL2 fue reprimida tras la exposición al polisacárido.

CCL5 o RANTES, es una quimioquina que atrae a las células T hacia los focos de inflamación y que se ha asociado con la EC y con los sitios en los cuales podría tener lugar el reclutamiento de los Th1 de forma descontrolada [218]; y expresada diferencialmente, tanto en células del sistema inmune como en células del epitelio intestinal. Es difícil predecir si el efecto, a nivel génico, observado para el EPS L (un incremento de 2 veces), pudo conllevar un aumento significativo de los niveles de la proteína CCL5, o si bien, su alteración dependa tan sólo de la enfermedad. Esta falta de concreción es debida a que, en estudios previos, se ha demostrado que el subtipo T CD8⁺ posee una elevada cantidad de mRNA de CCL5, pero que, sólo bajo un estímulo externo, el mRNA es utilizado para la síntesis de la proteína [218].

Si consideramos estos resultados junto con la disminución de la IL-8 a nivel proteico, observada en presencia de los EPSs bacterianos, los valores basales de la expresión génica de la IL-12p35 y la represión de la expresión de la IL1B (que en el caso del EPS P disminuyó hasta valores de inducción de 0,8 respecto al valor del control no tratado), se puede concluir que, posiblemente, una de las vías de la MAPK se estaría modulando, tal y como se había detectado previamente en el capítulo 2, cuando se estudiaron las rutas activadas por las proteínas fosforiladas en macrófagos humanos. Además, la modulación de RIPK1, CSF3 y CCL2 por el EPS L, podría conllevar un efecto inmunomodulador de este polímero sobre la expresión génica de la biopsia tratada. Así, la ruta de la p38 en la MAPK (que normalmente comporta un aumento de las citoquinas IL-8 e IL-1 β) podría estar jugando un papel importante en la

disminución de dichos marcadores de inflamación en el modelo *ex vivo* de mucosa intestinal inflamada [230].

A pesar de que, algunos genes asociados con la EC se sobre-expresaron tras el tratamiento con los EPSs (como el CCL5 con el EPS L y el CCL2 con el EPS P), se observó una disminución significativa de la IL-8 en el medio de cultivo, una represión de los niveles de expresión génica de la IL-12p35 (la subunidad específica de la IL-12), del NFκB y del TSLP por parte de los enterocitos (fig. 3 del capítulo 4).

La activación de STAT-1 fue totalmente inesperada, a pesar de ser unos de los mecanismos desregulados en la EC; pudiendo significar que en otros modelos su activación conduciría a efectos antivirales importantes.

Por otro lado, no se puede descartar que la activación, por parte de los dos EPS, de la vía de la apoptosis (fig. 10 del capítulo 4) pudiera conducir a la muerte programada de las células del sistema inmune. Como se ha demostrado, RIPK1 tiene un papel dual [229], ya que puede promover tanto la supervivencia como la muerte celular. Sus elevados niveles de expresión en presencia del EPS P (2,8) podrían situarlo en la vía del IL1R1, que también resultó estar sobre-expresado (tabla 3 del capítulo 4). Esta vía, tal como se muestra en las figuras 10 y 12 del capítulo 4, conduce a la apoptosis; mecanismo altamente alterado en el subtipo celular Th1 [228, 264]. En ese sentido, la comprensión de los mecanismos desencadenados por el EPS P y el EPS L es muy compleja, y una hipótesis podría involucrar, por un lado, el reconocimiento de los (1-3)-β-D-glucanos sustituidos en posición O-2 por parte de los receptores de membrana de los enterocitos y, por otro, el reconocimiento directo por parte del sistema inmune. El resultado de estas interacciones podría conducir a la inhibición y activación de vías relacionadas con la MAPK, que por un lado disminuirían la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (como la IL-8, la CSF3 y la IL-1β) y, por otro, fomentarían procesos que se han perdido al desarrollarse la patología (como la apoptosis de las células Th1 o la producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias). Asimismo, sería plausible que, las células M del lumen intestinal endociten a los polisacáridos, los fragmenten y los presenten al sistema

inmune de la lámina propia, a través de las células presentadoras del antígeno, generando una segunda vía para activar la respuesta inmune adaptativa [123].

4. Análisis comparativo de la influencia detectada de los (1-3)- β -D-glucanos y de la laminarina utilizando modelos *in vitro* y *ex vivo*

La primera aproximación realizada en este trabajo para estudiar la funcionalidad del EPS L y el EPS P, se realizó en modelos *in vitro* de macrófagos M1 (derivados de monocitos humanos) y de la línea celular monocitaria humana THP-1 (diferenciada a macrófagos con PMA) (ver el capítulo 2). Los resultados obtenidos demostraron que los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2 fueron capaces de inmunomodular los macrófagos humanos afectando a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-12p40) y anti-inflamatoria (IL-10), disminuyendo la proporción pro-inflamatoria TNF- α /IL-10 (LPS = 107, EPS L = 17, EPS P = 10) (fig. 9 del capítulo 2).

No obstante, las células PMA-THP-1 estimuladas con los EPSs no fueron capaces de secretar al medio extracelular niveles de TNF- α , IL-12p40 e IL-10 similares a los observados en los sobrenadantes de los cultivos de los macrófagos M1 tratados. El origen de esta respuesta diferencial es desconocido, ya que no parece ser debido a una falta generalizada de respuesta de los macrófagos PMA-THP-1, puesto que el tratamiento con el LPS de *E. coli* provocó un aumento significativo de los niveles del TNF- α y de la IL-12p40, en los dos modelos *in vitro*. Por otra parte, el protocolo de diferenciación utilizado en este trabajo (tratamiento de las células THP-1 con 40 mM de PMA durante 72 h), en la actualidad, es muy utilizado por la comunidad científica [180]. Sin embargo, algunos autores, entre ellos Daigneault *et al.* (2010) [164], han sugerido que las células PMA-THP-1, a pesar de considerarse un modelo *in vitro* útil (en sustitución del cultivo de macrófagos primarios humanos), pueden necesitar de un proceso de diferenciación específico, dependiendo del tipo de estímulo proporcionado, y que el tratamiento con PMA tenga que realizarse de forma discontinua, con intervalos de incubación en presencia de medio de cultivo sin dicho agente de diferenciación. Al mismo tiempo, se ha propuesto que concentraciones bajas de PMA pueden mejorar la respuesta de las células THP-1 a estímulos débiles [265], y que un primer estímulo (por ejemplo el LPS) sea necesario para que las

células PMA-THP-1 alcancen un estado fisiológico óptimo que les permita responder adecuadamente a un segundo estímulo (por ejemplo el EPS); de forma similar a un preconditionamiento [164]. De esta forma, la baja respuesta observada para las células PMA-THP-1, no implica necesariamente que estos macrófagos no sean capaces de responder al estímulo con los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2, sino que es factible que, para incrementar la respuesta al tratamiento, éste debiera realizarse con un protocolo diferente. Así, cuando las células PMA-THP-1 se trataron simultáneamente con el LPS y el EPS P o el EPS L (fig. 10 del capítulo 3), se observó una respuesta similar a la detectada sobre los macrófagos M1 (fig. 9 del capítulo 2). Ambos EPSs fueron capaces de disminuir la tasa inflamatoria provocada por el estímulo con el LPS, siendo el EPS L el polisacárido que más redujo la proporción pro-inflamatoria TNF- α /IL-10 (39 *versus* 29). La concentración de la IL-10 secretada por las células PMA-THP-1, tras el co-tratamiento con el EPS L y el LPS (600 pg mL⁻¹) (fig. 10 del capítulo 3), se encuentra en niveles cercanos a los liberados por los macrófagos M1 expuestos al EPS L (1000 pg mL⁻¹)(fig. 9 del capítulo 2). Dichos resultados permiten afirmar que las células PMA-THP-1 se activan cuando son tratadas con el LPS y los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2.

La comprobación y demostración *in vitro* de los efectos inmunomoduladores de los EPSs de BAL, a través de la estimulación de los macrófagos humanos, así como la comprobación y demostración de sus efectos moduladores en la respuesta inflamatoria subyacente; llevó a plantear el estudio del papel de estos polisacáridos en modelos de inflamación más complejos. Con este objetivo, en este trabajo de Tesis, también, se planteó una evaluación de los polímeros utilizando modelos *in vitro* y *ex vivo* de inflamación intestinal.

En la actualidad, la prevalencia de enfermedades inflamatorias intestinales ha aumentado significativamente en los países desarrollados, debido principalmente a los malos hábitos alimentarios y al estrés que el ritmo de vida impone a diario [266]. Dado el impacto que estas enfermedades tienen en la vida de los afectados, se están valorando diferentes estrategias terapéuticas que permitan mitigar sus efectos; puesto que los medicamentos, a día de hoy disponibles, causan importantes efectos

adversos y a largo plazo no son eficaces, lo que conduce en la mayoría de los casos a que los pacientes tengan que someterse a cirugía. En este contexto, el tratamiento con el EPS P o el EPS L podría mejorar las condiciones de estos enfermos, actuando a diferentes niveles: re-estableciendo la heterogeneidad de la microbiota (ya que estos pacientes poseen un número elevado de colinoides) [197, 222] dado del efecto prebiótico de dichos EPSs [44] , interactuando con las células del lumen intestinal y con las células del sistema inmune (para moderar los procesos inflamatorios), y bloqueando el sitio de unión de los patógenos. Algunos estudios han mostrado que la administración de algunos probióticos como *E coli* Nissle y cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Saccaromyces boulardii*, y *Clostridium butyricum* (algunos de ellos productores de EPS) [203-205], produce una mejora del estado de salud de los pacientes que padecen la EC. Del mismo modo, se ha comprobado que estas bacterias probióticas y sus EPSs favorecen la reducción de la inflamación intestinal, mejorando el balance entre células Th1 y Th2 (posiblemente a través de su interacción con el epitelio) [197]. Además, considerando que algunos EPSs se encuentran directamente involucrados en la modulación de la respuesta inmune innata, a través de la activación de las CDs y macrófagos, y de la respuesta adaptativa, a través de la modulación de las células T y de las células NK [191, 194], no resultaría sorprendente que muchos de los efectos beneficiosos definidos para los probióticos dependieran en gran parte de estos polímeros [202, 203]. Sin embargo, no consta que, hasta la realización de este trabajo de Tesis, se haya realizado ninguna evaluación directa de un posible efecto beneficioso de los EPSs bacterianos como coadyuvantes en pacientes con la EC, ni de los (1-3)- β -D-glucanos bacterianos en modelos *in vitro* de intestino inflamado.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta Tesis también se ha realizado una evaluación del EPS P y el EPS L, tanto en modelos *in vitro* de mucosa intestinal inflamada en co-cultivo con macrófagos, como utilizando biopsias de pacientes que padecían la EC; con el fin de explorar un potencial efecto beneficioso, e intentar determinar sus mecanismos de actuación. Además, este estudio individualizado, fue realizado teniendo en mente una posible futura aplicabilidad de estos compuestos como componente de alimentos funcionales, o como suplemento alimenticio.

El diseño experimental implicó una complejidad gradual en los modelos empleados, utilizando, en primer lugar, un modelo *in vitro*, utilizando el sistema de “transwell”, de co-cultivo de células de enterocitos (células de mucosa intestinal Caco-2) -compartimento superior- y células inmunes (PMA-THP-1) –compartimento inferior- (figs. 5, 8-9 del capítulo 3). Los macrófagos se estimularon con el LPS para simular un cuadro de inflamación crónica, y las células Caco-2 se trataron con los (1-3)- β -D-glucanos (figs. 8 y 9 del capítulo 3). Los experimentos descritos en la figura 6 del capítulo 3 (y resultados no mostrados), indicaron que los niveles de citoquinas determinados en el compartimento inferior del “transwell” eran debidos a la producción y secreción por parte de los macrófagos PMA-THP-1 y no por parte del dominio basolateral de los enterocitos; asumiendo, de aquí en adelante, esta interpretación como válida. Comparando la respuesta al tratamiento con los EPSs de las células PMA-THP-1 crecidas en monocultivo (con aplicación directa de los polímeros) y en co-cultivo con mucosa intestinal (con aplicación de los polisacáridos sobre los enterocitos), se detectó una respuesta diferencial de las mismas en cuanto a la secreción de mediadores inflamatorios. De esta forma, en condiciones de mucosa intestinal no inflamada (ausencia de tratamiento con el LPS) los niveles del TNF- α producido por los monocultivos de macrófagos estuvieron en el límite de detección del ensayo ELISA (fig. 1 Ia); mientras que la presencia de las células Caco-2 en co-cultivo, estimuló la secreción de dicha citoquina por las células PMA-THP-1, incrementándose los niveles en función del tiempo de tratamiento, siendo, después de 24 h de incubación, significativa la transducción de señal promovida por los EPSs ($p < 0,05$) (fig. 1 Ic).

Sin embargo, los niveles de secreción de la IL-10 por los macrófagos fueron similares en ambos tipos de cultivos, mostrando un incremento significativo de su concentración ($p < 0,05$) al tratar los macrófagos con los EPSs (fig. 1 IIa; IIb); no observándose su influencia después de 24 h de incubación en condiciones de co-cultivo (fig. 1 IIc), posiblemente debido al estímulo producido por las células Caco-2 sobre las PMA-THP-1 en el intervalo de 6 h a 24 h (incremento superior a 10 veces, fig. 1 IIb *versus* IIc). Estos resultados confirmaron el efecto inmunomodulador de los EPSs de BAL sobre macrófagos obtenidos por diferenciación de una línea celular,

tanto en su cultivo aislado como en co-cultivo con células epiteliales intestinales; demostrando, asimismo, el papel que juega la comunicación intercelular para la transmisión del estímulo y la activación de mecanismos de respuesta de las células en el modelo de inmunidad intestinal.

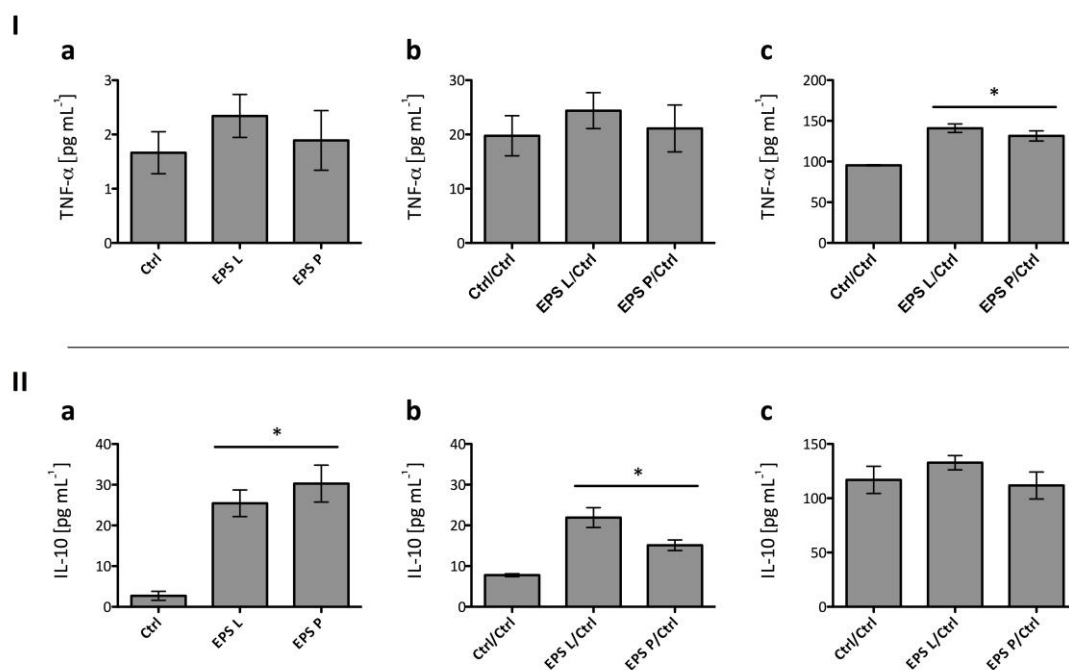


Figura 1. Efecto de los tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos durante 6 (b) ó 24 h (a y c) en la secreción del TNF-α (I) y de la IL-10 (II) por los macrófagos PMA-THP-1 en monocultivo (a) o en co-cultivo con los enterocitos Caco-2 (b y c). Se produjo un incremento significativo de los niveles de TNF-α tan sólo en los experimento de co-cultivo, después de 24 h de tratamiento. Se observó un incremento significativo de la IL-10, tanto en monocultivo a las 24 h, como en co-cultivo a las 6 h. * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado).

Por otro lado, cuando se comparó el comportamiento de los PMA-THP-1 frente al tratamiento con los EPSs, pero junto con la estimulación con el LPS, se comprobó que en el monocultivo de macrófagos, los niveles del TNF-α eran ligeramente inferiores respecto a los niveles secretados por las células en co-cultivo (fig. 2 Ia); observándose también en este último caso una ligera influencia inhibidora, sobre todo del EPS L, respecto al control sólo estimulado con el LPS (fig. 2 Ia). Respecto a la IL-10, el tratamiento con los polisacáridos determinó un aumento significativo de sus niveles, tanto en monocultivo (24 h, fig. 2 IIa) como en co-cultivo a las 6 h (fig. 2 IIb), sin observarse este efecto en este tipo de cultivo después de 24 h de co-tratamiento (fig. 2 IIc).

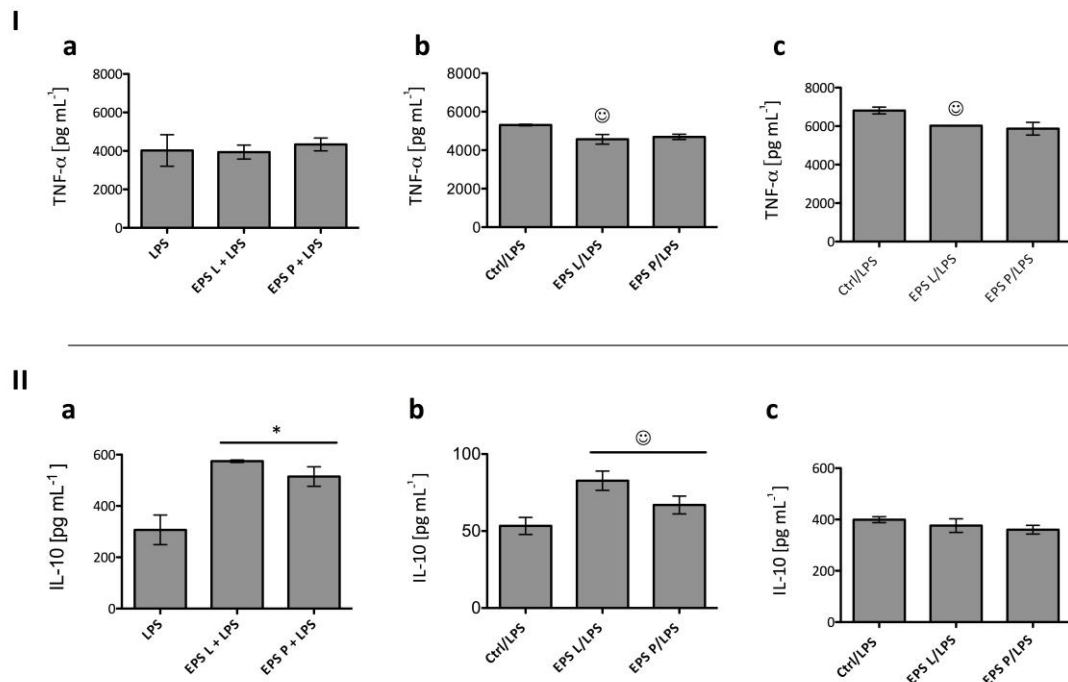


Figura 2. Efecto de los co-tratamientos con los (1-3)-β-D-glucanos y el LPS durante 6 (b) ó 24 h (a y c) en la secreción del TNF-α (I) y de la IL-10 (II) por los macrófagos PMA-THP-1 en monocultivo (a) o en co-cultivo con los enterocitos Caco-2 (b y c). Las concentraciones del TNF-α secretadas por los monocultivos tras el estímulo con el LPS no se afectaron con el co-tratamiento; mientras que se produjo una disminución significativa de sus niveles con el EPS L en co-cultivo. Los niveles de la IL-10 fueron significativamente superiores como respuesta a los co-tratamientos con los EPSs en macrófagos en monocultivos (24 h) y en co-cultivo (6 h), respecto a las muestras sólo estimuladas con el LPS; en especial en las muestras expuestas al EPS L. * Significación estadística, $p < 0,05$ (respecto al control no estimulado).

Las diferencias encontradas en los perfiles de citoquinas secretadas por las células PMA-THP-1, podrían estar relacionadas con el tipo de administración de los tratamientos; de forma que, en conjunto, la aplicación directa de los EPSs de BAL desencadenaría la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, mientras que la transducción de señal a los macrófagos debida a la interacción β-glucano-Caco-2, actuaría reduciendo los niveles de la citoquina pro-inflamatoria TNF-α.

La segunda aproximación experimental utilizada para corroborar el posible efecto beneficioso de los (1-3)-β-D-glucanos sustituidos en posición *O*-2 detectado en el modelo de co-cultivo, fue un modelo *ex vivo* de inflamación intestinal patológica, consistente en biopsias de pacientes con la EC. Este modelo permitió estudiar la respuesta del tejido intestinal, y de todos sus subtipos celulares, al EPS L y al EPS P; puesto que, en este modelo, el tejido mantiene sus características vitales durante el

procedimiento, pudiendo extrapolar los resultados a los de un caso real *in vivo*. A pesar de la variabilidad individual inherente a cada fragmento de tejido, este modelo ofreció, además, la posibilidad de analizar el efecto directo de los EPSs en una patología que conlleva una disfunción del sistema inmune en el intestino humano, aumentando los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y la población de células Th1 (respecto a las células Th2). La caracterización del perfil de secreción de las citoquinas TNF- α e IL-10, bajo los diferentes tratamientos, no permitió correlacionar la respuesta en el modelo *ex vivo* con la obtenida en el modelo *in vitro*; ya que en el primero no se encontraron diferencias significativas atribuibles a la exposición a los EPSs (fig. 2 del capítulo 4), mientras que en el segundo el tratamiento con los polímeros en condiciones de inflamación (estimulación con el LPS) determinó una reducción de los niveles del TNF- α a corto y a largo plazo, y un aumento de la concentración de la IL-10 sólo a corto plazo (fig. 2, 8 y 9 del capítulo 3). Sin embargo, la influencia del EPS L y el EPS P sobre los niveles de la IL-8 en ambos modelos, indicó un efecto inhibitorio sobre su secreción, observándose una disminución significativa de la concentración de dicha interleuquina tras el tratamiento con los dos EPSs y la laminarina en el modelo *ex vivo* (fig. 3 y 2 del capítulo 4 y fig. 12 del capítulo 3).

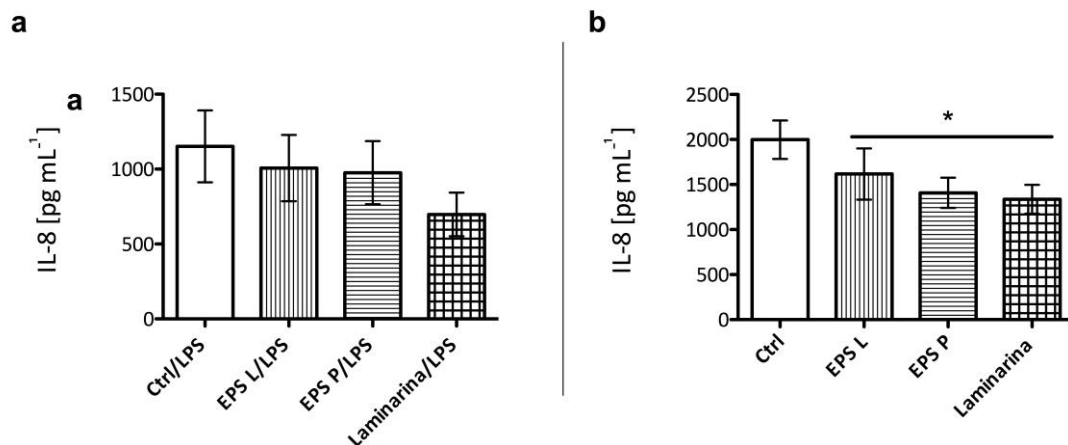


Figura 3. Efecto de los tratamientos con los (1-3)- β -D-glucanos en la secreción de la IL-8 en modelos de inflamación intestinal humana. a) Modelo *in vitro* de co-cultivo de las células Caco-2 y PMA-THP-1, después de 6 h de tratamiento, b) modelo *ex vivo* de biopsias de pacientes afectados por la EC, después de 4 h de tratamiento. En ambos modelos se observó una disminución de los niveles de esta citoquina tras el tratamiento con cada uno de los EPSs o con la laminarina. * Significación estadística, p < 0,05 (respecto al control no estimulado).

La IL-8 juega un papel importante en la respuesta inmune, al atraer a otras células inmunitarias; y su liberación, puede proceder tanto de células del epitelio intestinal como del pool de células del sistema inmune [189, 267]. Su secreción, además, aumenta la permeabilidad del lumen intestinal (gracias a la reorganización de las uniones fuertes intercelulares a lo largo del epitelio) [189]. A pesar de la función que ejerce en la eliminación de infecciones, su sobre-producción puede causar daño al epitelio, provocando incluso la muerte por necrotización [189]. Por ello, para poder comparar el efecto del tratamiento con los EPSs en el perfil de secreción de esta citoquina en ambos modelos, y dado que el tejido reúne diferentes categorías celulares capaces de contribuir a su secreción, para el modelo de co-cultivo, se han representado en la figura 3 la suma de los niveles de la IL-8 detectados en los sobrenadantes de las células epiteliales (Caco-2) y de los macrófagos PMA-THP-1. A pesar de este hecho, posiblemente al no estar presente en este modelo *in vitro* todos los tipos celulares del intestino, los valores obtenidos en fueron inferiores a los observados en el modelo *ex vivo* (fig. 3). Con el análisis independiente de los niveles de la citoquina detectados en cada compartimento, se comprobó que sólo las células Caco-2 mostraban una respuesta diferencial al tratamiento, incrementando los niveles de la IL-8 a las 6 h, y descendiendo significativamente a las 24 h (fig.12 del capítulo 3).

En lo referente al perfil de expresión génica de marcadores moleculares de inflamación, se pudo comprobar cómo los niveles de los mismos fueron mayores en el co-cultivo en respuesta a los estímulos, alcanzando valores más elevados, todavía, con el tiempo (24 h) (figs. 12 y 13 del capítulo 3), comparado con los valores observados en modelo *ex vivo*, (fig. 3 del capítulo 4). Si bien, períodos de incubación tan largos no fueron posibles de llevarse a cabo con el modelo *ex vivo*, dadas las limitaciones de vida del tejido [268]. Dichas diferencias puede ser debidas, por un lado, a que el modelo *in vitro* está formado por sólo dos líneas celulares inmortalizadas, y que, por tanto, no representan la complejidad del tejido (que también incluye el endotelio), a que no posee la variabilidad inherente a los pacientes (magnificada por tratamientos previos diferentes), y a que la estimulación

es, también, diferente en los dos modelos, representando las biopsias un modelo de inflamación crónica.

Por otra parte, durante el estudio en los modelos inflamatorios de intestino se utilizó, como control positivo de respuesta a (1-3)- β -glucanos ramificados (capítulos 3 y 4), la laminarina (polisacárido sustituido en posición O-6), dada su capacidad para unirse al receptor Dectin-1 (fig. 10 del capítulo 2) y para desencadenar una respuesta en las células del sistema inmune [207]. Asimismo, estudios previos han demostrado que el tratamiento de la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 con la laminarina, provoca un aumento de marcadores pro-inflamatorios como STAT-1, STAT-3, c-jun y c-fos [269]; mientras que utilizando un modelo intestinal porcino [209, 270], se ha detectado una represión de la expresión génica de marcadores inflamatorios como la IL-1 β y la IL-6. Sin embargo, hasta la realización de este trabajo de Tesis, se desconocía el efecto de este (1-3)- β -D-glucano en los modelos inflamatorios de intestino humano de co-cultivo (capítulo 3) y *ex vivo* (capítulo 4). En el modelo *in vitro* de co-cultivo, se pudo determinar un efecto inmunomodulador de este polisacárido en condiciones de inflamación de la mucosa intestinal. Se observó cómo la laminarina, después de 6 horas de tratamiento, provocó un incremento de la producción de IL-8 y un descenso de la IL-10, por parte de las células epiteliales (la secreción de dichas citoquinas por los macrófagos no se vio afectada); mientras que, a las 24 h, se observó una inhibición del cuadro inflamatorio, con una reducción global del TNF- α , y un aumento de la IL-10 y de la IL-8 en el epitelio. Estos resultados, por tanto, sugieren que la laminarina provoca una activación de la respuesta inmune tanto en las células del epitelio intestinal como en las células del sistema inmune. Los resultados obtenidos empleando el modelo *ex vivo* mostraron que, aparentemente, la laminarina tiene un efecto anti-inflamatorio superior al de los EPSs, ya que su tratamiento conlleva a una disminución de los niveles de la IL-8 secretados (fig. 3 y 2 del capítulo 4), no detectados a nivel de transcrito (fig. 3 del capítulo 4); aunque si provocó, al igual que el EPS L, un incremento de la expresión del NF κ B. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio, donde se emplearon biopsias de pacientes con la EC, fueron diferentes a los resultados de estudios realizados en modelo porcino, donde su administración a través de la dieta, determinó un aumento de IL-8 [270]. Es posible que las diferentes condiciones

experimentales (inflamación crónica e inflamación inducida) sean las causas de estas diferencias en la respuesta. Cabe resaltar que el co-tratamiento de la laminarina con LPS determinó un aumento de la IL-8 en el modelo de co-cultivo, así como lo demuestran Smith *et al.* (2011) [270]. Los β -glucanos son compuestos que activan la respuesta inmune determinando una respuesta pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, según el tipo de receptor activado [123] y, en particular, estos tipo de polímeros son capaces de activar la vía de señalización del NF κ B, que está involucrada en procesos biológicos como: activación, progresión del ciclo celular, supervivencia, adhesión, invasión e inflamación [271]. De esta manera es plausible pensar que, tanto el aumento como la disminución de la IL-8, sea el resultado de la modulación de esta vía.

En resumen, los estudios realizados en el presente trabajo de Tesis sobre procesos inflamatorios (usando modelos *in vitro* y *ex vivo*), han permitido incrementar los conocimientos sobre el modo de acción de los (1-3)- β -D-glucanos, e indican un potencial (del EPS L y el EPS P) como inmunoestimulantes de utilidad para el tratamiento de la EC.

5. Efecto antiviral de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2

Estudios previos han demostrado que los β -glucanos de levaduras, de hongos y de cereales con estructura β (1-3), tanto lineales como con ramificados en posición O-6, estimulan la respuesta inmune innata en mamíferos y peces [272]. El efecto suele ser dosis-dependiente y de duración breve. Asimismo, en otros estudios, se ha demostrado su utilidad como inmunoestimulantes para disminuir el riesgo de contraer enfermedades [273, 274]. En general, el uso de los β -glucanos como co-adyuvante es ampliamente reconocido, ya que sus efectos mejoran la respuesta inmune a diferentes niveles. Estudios en salmón atlántico (*Salmo salar* L.) han demostrado que el efecto de vacunas (cultivos de bacterias muertas por tratamiento con formalina: *Aeromonas salmonicida* y una mezcla de *A. salmonicida* y *Vibrio salmonicida*) mejoran su protección contra la forunculosis cuando son suplementadas con (1-3)- β -glucanos aislados de levadura [275]. Del mismo modo, se ha comprobado que la inyección de β -glucanos con enlaces β (1-3) y β (1-6), aislados

de micelios, aumentan la respuesta innata en los peces a través de la activación de los macrófagos, del complemento, y de las enzimas líticas [276]. Además, estos glucanos aumentan la defensa anti-bacteriana y la eficiencia de la vacunación, incluso cuando se administran oralmente; estimulando la respuesta inmune y la resistencia a enfermar. Así, para prevenir y controlar las enfermedades en piscifactorías, se están utilizando actualmente inmunoestimulantes como los β -glucanos (previamente comentados), solos o suplementados con otros compuestos como manosa, el LPS o la vitamina C [277]. Por otro lado, los resultados obtenidos en el capítulo 4 de este trabajo de Tesis, evidenciaron una modulación de la expresión de STAT-1 (un factor de transcripción asociado con la respuesta antiviral).

Con estos antecedentes se planteó un estudio *in vitro*, para investigar los efectos antivirales de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2 bacterianos, empleando para ello el virus de salmónidos VPNI y la línea celular BF-2 de *Lepomis macrochirus*. Al mismo tiempo, se analizó el posible efecto inmunomodulador, que pudieran tener el EPS L y el EPS P, sobre la expresión de dos IFN: el IFN-1 y el IFN- γ , implicados en la respuesta inmune innata y adaptativa de los salmónidos, respectivamente. Como sistema modelo se utilizaron macrófagos del riñón de trucha arco iris. Se eligieron este tipo de macrófagos, porque la parte anterior del riñón es el órgano interno de la trucha con mayor respuesta inmunológica. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con los EPSs de BAL reduce la infección por VPNI (fig. 2 del capítulo 5) y aumenta la expresión génica tanto del IFN-1 como del IFN- γ (fig. 3 del capítulo 5), demostrando su papel anti-viral e inmunoestimulante.

El mecanismo de acción para los β -glucanos no es del todo claro, se sabe que determina una activación del sistema inmune innato, a través de: un aumento de los leucocitos (incrementando las proporciones de neutrófilos y monocitos), un aumento de la secreción de macrófagos por parte del riñón anterior y de los niveles de mRNA de la IL-1 β , así como del sistema inmune adaptativo vía células T. Recientemente, se ha propuesto otro mecanismo de acción, usando un modelo de carpas alimentadas con β -glucanos y poli I:C; en el cual, la activación del TLR-3 podría resultar en un aumento de las proteínas inducidas por el IFN, y por tanto aumentar

la defensa contra los virus [278]. En este trabajo de Tesis doctoral, se ha demostrado una estimulación, no sólo de la respuesta innata, sino también de la respuesta adaptativa, provocada por los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2; confirmando, así, un amplio espectro de acción de estos polímeros en salmónidos. Por otra parte, los IFN son citoquinas esenciales en la lucha contra los virus y, aunque en este trabajo no se ha profundizado en el estudio del mecanismo de acción de los (1-3)- β -D-glucanos sustituidos en posición O-2 bacterianos, si se ha demostrado el papel inmunomodulador de otras moléculas utilizando como referencia estos marcadores. Nácher-Vázquez *et al.* (2015) [279] han demostrado que el EPS sintetizado por *Lb. sakei* MN1 (un dextrano con enlaces $\alpha(1-6)$, prácticamente lineal y con aproximadamente 6 % de sustituciones en posición O-3), tiene un efecto antiviral frente a dos virus de salmónidos con un mecanismo de replicación diferente (el VPNI y el virus infeccioso de la necrosis hematopoyética). Los resultados obtenidos en dicho estudio, tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*, indican que tal efecto antiviral es presumiblemente debido, como en el caso de los EPSs descrito en esta Tesis, a una estimulación del sistema inmune, incluyendo el incremento de la expresión génica de interferones implicados en la respuesta innata y adaptativa.

En consecuencia, tanto el EPS L como el EPS P, tienen potencial como coadyuvantes o suplementos alimenticios, para el desarrollo de piensos funcionales para salmónidos. La validación de esta hipótesis y su posterior utilización en piscifactorías requiere una experimentación futura previa, para evaluar si su uso es realmente de utilidad y tiene interés comercial.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis doctoral han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Se han estandarizado métodos de producción y purificación válidos para el EPS L y el EPS P, dos (1-3)- β -D-glucanos ramificados en posición O-2, producidos por las bacterias ácido lácticas *L. lactis* y *P. parvulus*. Los métodos han consistido en utilizar medios de crecimiento definidos o semidefinidos para su producción; recuperar y concentrar los polisacáridos a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos por precipitación con etanol y purificarlos por re-precipitaciones con dicho alcohol, diálisis y fraccionamiento cromatográfico de exclusión.
2. Se han obtenido preparaciones puras del EPS L y del EPS P carentes de contaminación detectable por DNA, RNA y proteínas, sin alteración de su estructura química o de su masa molecular.
3. Se ha demostrado que El EPS L y el EPS P no tienen efecto citotóxico *in vitro* sobre macrófagos humanos pro-inflamatorios: tanto los M1 obtenidos a partir de monocitos por diferenciación con GM-CSF, como los PMA-THP-1 obtenidos a partir de la línea celular THP-1 monocitaria diferenciada con PMA.
4. El tratamiento con el EPS L o con el EPS P, produce un balance anti-inflamatorio de citoquinas en modelos *in vitro* de macrófagos humanos M1 y PMA-THP-1 estimulados con el LPS de *E. coli*.
5. El EPS L y el EPS P alteran el patrón de fosforilación de quinasas en macrófagos M1, activando las vías de señalización del PI3K/mTOR/AKT, del ErbB y de las uniones adherentes, implicadas en procesos de migración, proliferación y supervivencia celular.

6. Tanto el EPS P como el EPS L no tienen efecto citotóxico en el modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano generado con la línea celular Caco-2.
7. El co-cultivo en formato de insertos “*transwell*” de los enterocitos Caco-2 y los macrófagos PMA-THP-1, estimulados estos últimos con LPS, constituye un modelo *in vitro* de mucosa intestinal humana inflamada.
8. En el modelo *in vitro* de mucosa intestinal inflamada, el co-tratamiento de las PMA-THP-1 con el LPS de *E. coli* y de las Caco-2 con el EPS L o el EPS P tiene efectos inmunomoduladores:
 - sobre los macrófagos PMA-THP-1, aumentando, después de 6 h de tratamiento, los niveles de expresión génica y proteica de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, y reduciendo después de tratamientos prolongados (24 h), los niveles de expresión proteica de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α .
 - sobre las células Caco-2, aumentando, después de 6 horas de exposición, los niveles de expresión génica y proteica de la citoquina pro-inflamatoria IL-8, y, también, incrementando los niveles de expresión génica y proteica de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, después de 24 horas de tratamiento.
9. En un modelo *ex vivo* de enfermedad de Crohn, tanto el EPS L como el EPS P disminuyen los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-8, en el sobrenadante de las biopsias de tejido, y modulan en ellas la expresión de los genes RIPK-1, CSF-3, CCL2, STAT-1, IKBKE, IL-1B e IL-1A.
10. El EPS L y EPS P alteran el perfil de expresión de genes de vías de señalización del NFkB en las biopsias del tejido intestinal de los enfermos de Crohn, afectando a mecanismos de inflamación, quimiotaxis, diferenciación, proliferación y muerte celular.

11. Los efectos inmunomoduladores del EPS L y del EPS P en células intestinales humanas no dependen, al menos exclusivamente, de su unión al receptor Dectin-1.
12. El EPS L y el EPS P tienen efecto antiviral (reducción del daño citopático y del título viral) frente a la infección de la línea celular de fibroblastos BF-2 de salmónidos por el virus de la necrosis pancreática infecciosa.
13. El EPS L y el EPS P poseen actividad inmunoestimulante sobre macrófagos de riñón de trucha arco iris:
 - sobre la respuesta inmune innata, aumentando la expresión del gen que codifica el IFN-1.
 - sobre la respuesta inmune adaptativa, aumentando los niveles de expresión del gen que codifica el IFN- γ .

BIBLIOGRAFÍA

1. Orla-Jensen, S., Lactic Acid Bacteria. Høst. 1919.
2. Bern, M. and Goldberg, D. Automatic selection of representative proteins for bacterial phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*, 2005. 5: p. 34.
3. Parra Huertas, R.A. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2010. 8(1): p. 1-13.
4. Ekinci, F.Y. and Gurel, M. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *Journal of dairy science*, 2008. 91(3): p. 892-899.
5. von Wright, A. and Axelsson, L. Lactic acid bacteria : an introduction. 2012 CRC Press. p. 1-16.
6. Savadogo, A., Ouattara, A.C., Bassole, H.I., and Traore, S.A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 2006. 5(9): p. 678-683.
7. Uniprot.
<http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=lactobacillales&sort=score>.
8. EFSA. Statement of the scientific panel of food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the european commission concerning. *EFSA Journal*, 2008. 2008(7): p. 1-2.
9. Durlu-Özkaya, F., Aslim, B., and Ozkaya, M.T. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 2007. 40(3): p. 564-568.
10. Vazquez, J.A. and Murado, M.A. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008. 43(1): p. 7-7.
11. Kailasapathy, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 2006. 39(10): p. 1221-1227.
12. Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. Bacteriocins a viable alternative to antibiotics? *Nature Review of Microbiology*, 2013. 11(2): p. 95-105.
13. Sutherland, I.W. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 1972. 8: p. 143-213.
14. Dueñas-Chasco, M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., and Gil-Serrano, A.M. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*, 1997. 303(4): p. 453-458.
15. Kumari, M., Survase, S.A., and Singhal, R.S. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. *Bioresource technology*, 2008. 99(5): p. 1036-1043.
16. Pavlova, K., Panchev, I., Krachanova, M., and Gocheva, M. Production of an exopolysaccharide by antarctic yeast. *Folia Microbiologica*, 2008. 54(4): p. 343-348.
17. Sun, L., Wang, C., Ma, C., and Shi, L. Optimization of renewal regime for improvement of polysaccharides production from *Porphyridium cruentum* by uniform design. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010. 33(3): p. 309-315.

18. Imeson, A., Food stabilisers, thickeners and gelling agents 2011: John Wiley & Sons.
19. Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martínez-Pomares, L., Wong, S.Y.C., and Gordon, S. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 2002. 196(3): p. 407-412.
20. Chan, G.C., Chan, W.K., and Sze, D.M. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2009. 2: p. 1-11.
21. Othman, R.A., Moghadasian, M.H., and Jones, P.J. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan. *Nutrition Reviews*, 2011. 69(6): p. 299-309.
22. Donot, F., Fontana, A., and Baccou, J.C. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 2012. 87(2): p. 951-962.
23. Kothari, D. and Goyal, A. Structural characterization of enzymatically synthesized dextran and oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextransucrase. *Biochemistry*, 2013. 78(10): p. 1164-1170.
24. Bowen, W.H. and Koo, H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries research*, 2011. 45(1): p. 69-86.
25. Côté, G.L. and Robyt, J.F. Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan. *Carbohydrate Research*, 1982. 101(1): p. 57-74.
26. Tapola, N. and Sarkkinen, E. Oat β -glucan, Sungsoo Cho, S. and Samuel, P., Editors. 2009 CRC Press. p. 283-303.
27. Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.M., and Remaud-Siméon, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 2000. 11(9): p. 675-685.
28. Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G.R., and Nicolaus, B. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, 2010. 2011 p. 1-13.
29. Poli, A., Anzelmo, G., and Nicolaus, B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*, 2009. 8(6): p. 1779-1802.
30. Freitas, F., Alves, V.D., and Reis, M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 2011. 29(8): p. 388-398.
31. Rehm, B., Microbial production of biopolymers and polymer precursors 2009: Horizon Scientific Press.
32. Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., and de los Reyes-Gavilán, C.G. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides, in *Bacterial polysaccharides current innovations and further trends*, Ullrich, M., Editor. 2009 Caier Academic Press.
33. Werning, M.L., Notararigo, S., Nácher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., and López, P. Biosynthesis, purification and biotechnological use of

- exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, in *Food additive*. 2012 In Tech.
34. Gänzle, M.G. and Follador, R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Frontiers in microbiology*, 2011. 3: p. 340-355.
 35. Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J., and López, P. *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of beta-D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*, 2006. 69(1): p. 161-169.
 36. Werning, M.L., Corrales, M.A., Prieto, A., Fernández de Palencia, P., Navas, J., and López, P. Heterologous expression of a position 2-substituted (1-3)- β -D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology*, 2008. 74(16): p. 5259-5262.
 37. Karnezis, T., Epa, V.C., Stone, B.A., and Stanisich, V.A. Topological characterization of an inner membrane (1-3)-beta-D-glucan (curdlan) synthase from *Agrobacterium* sp. strain ATCC31749. *Glycobiology*, 2003. 13(10): p. 693-706.
 38. van Hijum, S.A., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., and van Geel-Schutten, I.G. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology Molecular Biology Review*, 2006. 70(1): p. 157-176.
 39. Korakli, M. and Vogel, R.F. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006. 71(6): p. 790-803.
 40. Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F., and de los Reyes-Gavilán, C.G. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, Mayo, B., López, P., and Pérez Martínez, G., Editors. 2008 Research Sighpost.
 41. Higgins, M.J. and Novak, J.T. Characterization of exocellular protein and its role in biofloculation. *Journal of Environmental Engineering*, 1997. 123(5): p. 479-485.
 42. Rao, T.J.M. and Goyal, A. A novel high dextran yielding *Weissella cibaria* JAG8 for cereal food application. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2013. 64(3): p. 346-354.
 43. Mårtensson, O., Biörklund, M., and Lambo, A.M. Fermented, ropy, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutrition research*, 2005. 25(5): p. 429-442.
 44. Russo, P., López, P., Capozzi, V., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M.T., Spano, G., and Fiocco, D. Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011. 13(5): p. 6026-6039.
 45. Du, B., Bian, Z., and Xu, B. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: a review. *Phytotherapy Research*, 2014. 28(2): p. 159-166.
 46. Gallagher, E., Gormley, T.R., and Arendt, E.K. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology*, 2004. 15(1-3): p. 143-152.

47. Freitas, F., Alves, V.D., Reis, M.A., Crespo, J.G., and Coelho, I.M. Microbial polysaccharide-based membranes: current and future applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 2013. 131(6): p. 1-11.
48. de Vrese, M. and Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics, in *Food Biotechnology*, Stahl, U., Donalies, U.B., and Nevoigt, E., Editors. 2008 Springer Berlin Heidelberg. p. 1-66.
49. FAO and WHO. Report of the Joint FAO/WHO. Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria 2001.
50. Mäyrä-Mäkinen, A. and Bigret, M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. in *Lactic acid bacteria*, Salminen, S., von Wright, A., and Ouwehan, A., Editors. 2004 CRC Press. p. 175-198.
51. Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Nevado, F.P., and de Guía Córdoba, M. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat science*, 2008. 80(3): p. 715-721.
52. Ammor, M.S., Flórez, A.B., and Mayo, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, 2007. 24(6): p. 559-570.
53. Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 1995. 125(6): p. 1401-1412.
54. Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., and Roberfroid, M.B. Scientific concepts in functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 1999. 81(Suppl 1): p. S1-S27.
55. Roberfroid, M.M. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*, 2007. 137(Suppl 2): p. 830S-837S.
56. Scholz-Ahrens, K.E.K., Ade, P.P., Marten, B.B., Weber, P.P., Timm, W.W., Açil, Y.Y., Glüer, C.-C.C., and Schrezenmeir, J.J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *Journal of Nutrition*, 2007. 137(Suppl 2): p. 838S-846S.
57. Saez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Research International*, 2015. 2015: p. 505878.
58. FAO and AGSN, *Technical meeting on Prebiotics*. 2007. p. 1-12.
59. Ramanamma, M.V. Prebiotics and their benefits on human health. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2012. 1(1): p. 3-6.
60. Viborg, A.H., Katayama, T., Abou Hachem, M., Andersen, M.C., Nishimoto, M., Clausen, M.H., Urashima, T., Svensson, B., and Kitaoka, M. Distinct substrate specificities of three glycoside hydrolase family 42 beta-galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Glycobiology*, 2014. 24(2): p. 208-216.
61. Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., Ramasamy, U., Schols, H.A., and De Vos, P. Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015. 55(3): p. 414-436.

62. Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., and Bunesova, V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Beneficial Microbes*, 2014. 5(3): p. 273-283.
63. Hsieh, C.C., Hernández-Ledesma, B., Fernández-Tome, S., Weinborn, V., Barile, D., and de Moura Bell, J.M. Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: effects against the 21st century disorders. *Biomed Research International*, 2015. 2015: p. 1-16.
64. Ruas-Madiedo, P. and de los Reyes-Gavilán, C.G. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 2005. 88(3): p. 843-856.
65. Werning, M.L., Pérez-Ramos, A., Fernández de Palencia, P., Mohedano, M.L., Dueñas, M.T., Prieto, A., and López, P. A specific immunological method to detect and quantify bacterial 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan. *Carbohydrate Polymers*, 2014. 113: p. 39-45.
66. Stack, H.M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., and Ross, R.P. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal *Lactobacilli*. *Applied and environmental microbiology*, 2009. 76(2): p. 500-507.
67. Fernández de Palencia, P., Werning, M.L., Sierra-Filardi, E., Dueñas-Chasco, M., Irastorza, A., Corbí, A.L., and López, P. Probiotic properties of the 2-substituted (1-3)- β -D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and environmental microbiology*, 2009.
68. Garai-Ibabe, G., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M.L., López, P., Corbí, A.L., and Fernández de Palencia, P. Naturally occurring 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource technology*, 2010. 101(23): p. 9254-9263.
69. Iwasaki, A. and Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 2015. 16(4): p. 343-353.
70. Aderem, A. and Ulevitch, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000. 406(6797): p. 782-787.
71. Takeda, K. and Akira, S. Toll-Like receptors, in *Current Protocols in Immunology*. 2001 John Wiley & Sons, Inc.
72. Janeway, C.A.J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J., Immunobiology 2001: Garland Science.
73. Lien, E. and Ingalls, R.R. Toll-like receptors. *Critical care medicine*, 2002. 30(1 Supp): p. S1-S11.
74. Randow, F., MacMicking, J.D., and James, L.C. Cellular self-defense: how cell-autonomous immunity protects against pathogens. *Science*, 2013. 340(6133): p. 701-706.
75. Cummings, J.H., Antoine, J.M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P.C., Gibson, G.R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijtelars, S., and Watzl, B. Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 2004. 43 Suppl 2: p. II/118-II/173.

76. Stagg, A.J., Hart, A.L., and Knight, S.C. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2004. 18(2): p. 255-270.
77. Isolauri, E., Sūtas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., and Salminen, S. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001. 73(2): p. 444s-450s.
78. Vandenplas, Y. Healthy gut microbiota and long term health. *Beneficial Microbes*, 2015. 6(2): p. 173-179.
79. Zhang, H., Sparks, J.B., Karyala, S.V., Settlage, R., and Luo, X.M. Host adaptive immunity alters gut microbiota. *ISME J*, 2015. 9(3): p. 770-781.
80. Maranduba, C.M., De Castro, S.B., de Souza, G.T., Rossato, C., da Guia, F.C., Valente, M.A., Rettore, J.V., Maranduba, C.P., de Souza, C.M., do Carmo, A.M., Macedo, G.C., and Silva, F.S. Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis. *Journal of Immunology Research*, 2015. 2015: p. 931574.
81. Ohland, C.L. and Jobin, C. Microbial activities and intestinal homeostasis: a delicate balance between health and disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2015. 1(1): p. 28-40.
82. Morgan, M.E.; Available from: <http://theibdimmunologist.com/>.
83. Monteleone, G., Holloway, J., Salvati, V.M., Pender, S.L.-F., Fairclough, P.D., Croft, N., and MacDonald, T.T. Activated STAT4 and a functional role for IL-12 in human Peyer's patches. *Journal of immunology*, 2002. 170(1): p. 300-307.
84. Kotaki, R., Wajima, S.I., Shiokawa, A., and Hachimura, S. Toll-like receptor 2 suppresses Toll-like receptor 9 responses in Peyer's patch dendritic cells. *Immunobiology*, 2015.
85. MacDonald, T. Introduction. *Seminars in Immunology*, 2001. 13(3): p. 159-161.
86. Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., and Pabst, O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+Regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*, 2010. 34(2): p. 237-246.
87. Shao, L., Serrano, D., and Mayer, L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Seminars in Immunology*, 2001. 13(3): p. 163-176.
88. Lu, L. and Walker, W.A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001. 73(6): p. 1124S-1130S.
89. Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugière, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J.K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*, 2003. 52(12): p. 1690-1697.
90. Vezys, V., Olson, S., and Lefrançois, L. Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity*, 2000. 12(5): p. 505-514.
91. Miron, N. and Cristea, V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clinical & Experimental Immunology*, 2012. 167(3): p. 405-412.

92. Ohman, L., Tornblom, H., and Simren, M. Crosstalk at the mucosal border: importance of the gut microenvironment in IBS. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2015. 12(1): p. 36-49.
93. Abreu, M.T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L.S., Arnold, E.T., and Arditi, M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of immunology*, 2001. 167(3): p. 1609-1616.
94. Abreu, M.T., Arnold, E.T., Thomas, L.S., Gonsky, R., Zhou, Y., Hu, B., and Arditi, M. TLR4 and MD-2 Expression Is Regulated by Immune-mediated Signals in Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(23): p. 20431-20437.
95. Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., and Rogler, G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 2002. 122(7): p. 1987-2000.
96. Cario, E. and Podolsky, D.K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, 2000. 68(12): p. 7010-7017.
97. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., and Rowland, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 1998. 80 (Suppl 1): p. S147-171.
98. Schwartz, B. and Hadar, Y. Possible mechanisms of action of mushroom-derived glucans on inflammatory bowel disease and associated cancer. *Annals of Translational Medicine*, 2014. 2(2): p. 1-19.
99. Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of experimental medicine*, 2003. 197(9): p. 1119-1124.
100. Volman, J.J., Ramakers, J.D., and Plat, J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiology Behavior*, 2008. 94(2): p. 276-284.
101. Volman, J.J., Mensink, R.P., Buurman, W.A., Onning, G., and Plat, J. The absence of functional dectin-1 on enterocytes may serve to prevent intestinal damage. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2010. 22(1): p. 88-94.
102. Wasser, S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011. 89(5): p. 1323-1332.
103. Pillemer, L. and Ecker, E. Anticomplementary factor in fresh yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 1941(137): p. 139-142.
104. Czop, J.K. and Austen, K.F. Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor. *Journal of Immunology*, 1985. 135(5): p. 3388-3393.
105. Brown, G.D. and Gordon, S. Immune recognition: a new receptor for β -glucans. *Nature*, 2001. 413: p. 36-37.
106. Williams, D.L. Overview of (1-3)-beta-D-glucan immunobiology. *Mediators of Inflammation*, 1997. 6(4): p. 247-250.

107. Kulicke, W.M., Lettau, A.I., and Thielking, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1-3)- β -D-glucans. *Carbohydrate Research*, 1997. 297(2): p. 135-143.
108. Brown, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Review Immunology*, 2006. 6(1): p. 33-43.
109. Chlubnová, I., Sylla, B., Nugier-Chauvin, C., Daniellou, R., Legentil, L., Kralová, B., and Ferrières, V. Natural glycans and glycoconjugates as immunomodulating agents. *Natural product reports*, 2011. 28(5): p. 937-952.
110. Thompson, I.J., Oyston, P.C., and Williamson, D.E. Potential of the β -glucans to enhance innate resistance to biological agents. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2010. 8(3): p. 339-352.
111. Lee, D.H. and Kim, H.W. Innate immunity induced by fungal beta-glucans via dectin-1 signaling pathway. *International Journal Medicinal Mushrooms*, 2014. 16(1): p. 1-16.
112. Yanaki, T., Ito, W., Tabata, K., Kojima, T., Norisuye, T., Takano, N., and Fujita, H. Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophysical chemistry*, 1983. 17(4): p. 337-342.
113. Ruas-Madiedo, P. Biosynthesis and bioactivity of exopolysaccharides produced by probiotic bacteria, in *Food Oligosaccharides*. 2014 John Wiley & Sons, Ltd. p. 118-133.
114. Foligne, B., Nutton, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poirer, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., and Pot, B. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, 2007. 13(2): p. 236-243.
115. Kim, H.S., Hong, J.T., Kim, Y., and Han, S.B. Stimulatory effect of beta-glucans on immune cells. *Immune Network*, 2011. 11(4): p. 191-195.
116. Ujita, M., Nagayama, H., Kanie, S., Koike, S., Ikeyama, Y., Ozaki, T., and Okumura, H. Carbohydrate binding specificity of recombinant human macrophage beta-glucan receptor dectin-1. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2009. 73(1): p. 237-240.
117. Thornton, B.P., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R.C., and Ross, G.D. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *Journal of Immunology*, 1996. 156(3): p. 1235-1246.
118. Vereschagin, E.I., van Lambalgen, A.A., Dushkin, M.I., Schwartz, Y.S., Polyakov, L., Heemskerk, A., Huisman, E., Thijs, L.G., and van den Bos, G.C. Soluble glucan protects against endotoxin shock in the rat: the role of the scavenger receptor. *Shock*, 1998. 9(3): p. 193-198.
119. Rice, P.J., Kelley, J.L., Kogan, G., Ensley, H.E., Kalbfleisch, J.H., Browder, I.W., and Williams, D.L. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1-3)-beta-D-glucans. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002. 72(1): p. 140-146.
120. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. *Annuals Review of Immunology*, 2000. 18: p. 767-811.

121. Adams, E.L., Rice, P.J., Graves, B., Ensley, H.E., Yu, H., Brown, G.D., Gordon, S., Monteiro, M.A., Papp-Szabo, E., Lowman, D.W., Power, T.D., Wempe, M.F., and Williams, D.L. Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008. 325(1): p. 115-123.
122. Underhill, D.M., Rossmagle, E., Lowell, C.A., and Simmons, R.M. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*, 2005(6): p. 2543-2550.
123. Savelkoul, H.F.J., Chanput, W., and Wichers, H.J. Immunomodulatory effects of mushroom B-glucans, en *Diet, immunity and inflammation*, Calder, P.C. and Yaqoob, P., Editors. 2013 Woodhead Publishing. p. 416-434.
124. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 2014. 42(D1): p. D199-D205.
125. Goodridge, H.S., Wolf, A.J., and Underhill, D.M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunological Reviews*, 2009. 230(1): p. 38-50.
126. Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *Journal of Experimental Medicine*, 2003. 197(9): p. 1107-1117.
127. Liu, C.F., Tseng, K.C., Chiang, S.S., Lee, B.H., Hsu, W.H., and Pan, T.M. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011. 91(12): p. 2284-2291.
128. Welman, A.D. and Maddox, I.S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 2003. 21(6): p. 269-274.
129. Lee, Y.K. and Salminen, S., Handbook of Probiotics and Prebiotics 2009: John Wiley & Sons.
130. Dols-Lafargue, M., Lee, H.Y., Le Marrec, C., Heyraud, A., Chambat, G., and Lonvaud-Funel, A. Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Applied and environmental microbiology*, 2008. 74(13): p. 4079-4090.
131. Ibarburu, I., Soria-Díaz, M.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Velasco, S.E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A.M., Irastorza, A., and Dueñas, M.T. Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of applied microbiology*, 2007. 103(2): p. 477-486.
132. Llauberes, R.M., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdieu, D., and Fournet, B. Structure of an exocellular beta-D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carbohydr Research*, 1990. 203(1): p. 103-107.
133. Garai-Ibabe, G., Areizaga, J., Aznar, R., Elizaquivel, P., Prieto, A., Irastorza, A., and Dueñas, M.a.T. Screening and selection of 2-branched (1,3)-beta-D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. 58(10): p. 6149-6156.

134. Velasco, S.E., Yebra, M.J., Monedero, V., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., and Irastorza, A. Influence of the carbohydrate source on beta-glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*, 2007. 115(3): p. 325-334.
135. Velasco, S., Arskold, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Radstrom, P., and van Niel, E.W. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*, 2006. 111(3): p. 252-258.
136. Sánchez, C., Neves, A.R., Cavaleiro, J., dos Santos, M.M., García-Quintans, N., López, P., and Santos, H. Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Applied Environmental Microbiology*, 2008. 74(4): p. 1136-1144.
137. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry (Washington)*, 1956. 28(3): p. 350-356.
138. Maeyama, R., Mizunoe, Y., Anderson, J.M., Tanaka, M., and Matsuda, T. Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2004. 70(2): p. 274-282.
139. Laine, R.A., Griffin, P.F., Sweeley, C.C., and Brennan, P.J. Monoglucosyloxyoctadecenoic acid -a glycolipid from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*, 1972. 11(12): p. 2267-2271.
140. Ciucanu, I. and Kerek, F. Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas—liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1984.
141. Kumar, A.S., Mody, K., and Jha, B. Bacterial exopolysaccharides -a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 2007. 47(2): p. 103-117.
142. Leal, J.A., Prieto, A., Bernabé, M., and Hawksworth, D.L. An assessment of fungal wall heteromannans as a phylogenetically informative character in ascomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010. 34(6): p. 986-1014.
143. Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Prieto, A., Calle, L.P., and de los Reyes-Gavilán, C.G. Characterization of exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* NB667 and its cholate-resistant derivative strain IPLA B667dCo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. 60(4): p. 1028-1035.
144. Notararigo, S., Nácher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M.L., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M.T., Aznar, R., López, P., and Prieto, A. Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 2013. 93(1): p. 57-64.
145. Ruas-Madiedo, P., Moreno, J.A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., and de los Reyes-Gavilán, C.G. Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 2007. 73(13): p. 4385-4388.
146. Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Pérez, P.F., and Abraham, A.G. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* the cytotoxic effect of bacterial

- toxins on eukaryotic cells. *Journal of applied microbiology*, 2010. 109(6): p. 2079-2086.
147. Salazar, N., López, P., Garrido, P., Moran, J., Cabello, E., Gueimonde, M., Suárez, A., González, C., de los Reyes-Gavilán, C.G., and Ruas-Madiedo, P. Immune modulating capability of two exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains in a Wistar rat model. *Biomed Research International*, 2014. 2014: p. 106-115.
 148. Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 1991. 47(1): p. 22-31.
 149. Patten, D.A., Leivers, S., Chadha, M.J., Maqsood, M., Humphreys, P.N., Laws, A.P., and Collett, A. The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. *rosyjski* and *Lactobacillus acidophilus* sp. 5e2. *Carbohydrate Research*, 2014. 384(0): p. 119-127.
 150. Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., and Kodama, T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal Atherosclerosis Thrombosis*, 2004. 11(2): p. 88-97.
 151. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., and Dieter, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996. 59(4): p. 555-561.
 152. Tsuchiya, S., Minegishi, N., Minegishi, M., Sato, T., and Konno, T. Adaptation of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) in a protein-free chemically defined medium. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1986. 150(4): p. 455-465.
 153. Adams, D.O. and Hamilton, T.A. The cell biology of macrophage activation. *Annual Review of Immunology*, 1984. 2: p. 283-318.
 154. Reyes, L., Davidson, M.K., Thomas, L.C., and Davis, J.K. Effects of *Mycoplasma fermentans* incognitus on differentiation of THP-1 cells. *Infect Immun*, 1999. 67(7): p. 3188-3192.
 155. Arnaout, M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 1990. 75(5): p. 1037-1050.
 156. Shah, V.B., Williams, D.L., and Keshvara, L. β -Glucan attenuates TLR2- and TLR4-mediated cytokine production by microglia. *Neuroscience Letters*, 2009. 458(3): p. 111-115.
 157. Seger, R. and Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 1995. 9(9): p. 726-735.
 158. de las Casas-Engel, M., Domínguez-Soto, A., Sierra-Filardi, E., Bragado, R., Nieto, C., Puig-Kroger, A., Samaniego, R., Loza, M., Corcuera, M.T., Gómez-Aguado, F., Bustos, M., Sánchez-Mateos, P., and Corbí, A.L. Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. *Journal of Immunology*, 2013. 190(5): p. 2301-2310.
 159. Watanabe, K. and Jaffe, E.A. Comparison of the potency of various serotypes of *E. coli* lipopolysaccharides in stimulating PGI2 production and suppressing ACE activity in cultured human umbilical vein endothelial cells.

- Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 1993. 49(6): p. 955-958.
160. Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 2008. 4(1): p. 44-57.
 161. Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012. 122(5): p. 1615-1627.
 162. Armstrong, L., Jordan, N., and Millar, A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*, 1996. 51(2): p. 143-149.
 163. Saraiva, M. and O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Review Immunology*, 2010. 10(3): p. 170-181.
 164. Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K., and Dockrell, D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 2010. 5(1): p. e8668.
 165. Goodridge, H.S., Reyes, C.N., Becker, C.A., Katsumoto, T.R., Ma, J., Wolf, A.J., Bose, N., Chan, A.S., Magee, A.S., Danielson, M.E., Weiss, A., Vasilakos, J.P., and Underhill, D.M. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature*, 2011. 472(7344): p. 471-475.
 166. Hart, J.R. and Vogt, P.K. Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget*, 2011. 2(6): p. 467-476.
 167. Hemmings, B.A. and Restuccia, D.F. The PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 2015. 7(4): p. 1-3.
 168. Günzl, P., Bauer, K., Hainzl, E., Matt, U., Dillinger, B., Mahr, B., Knapp, S., Binder, B.R., and Schabbauer, G. Anti-inflammatory properties of the PI3K pathway are mediated by IL-10/DUSP regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010. 88(6): p. 1259-1269.
 169. Weichhart, T. and Saemann, M.D. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Annals Rheumatic Disease*, 2008. 67 (Suppl 3): p. 70-74.
 170. Byeon, S.E., Yi, Y.S., Oh, J., Yoo, B.C., Hong, S., and Cho, J.Y. The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators of Inflammation*, 2012. 2012: p. 512926.
 171. Guinane, C.M. and Cotter, P.D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2013. 6(4): p. 295-308.
 172. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Review of Immunology*, 2009. 9(11): p. 799-809.
 173. Deferme, S., Annaert, P., and Augustijns, P. *In vitro* screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism, in *Drug Absorption Studies*, Ehrhardt, C. and Kim, K.-J., Editors. 2008 Springer US. p. 182-215.

174. Kauffman, A.L., Gyurdieva, A.V., Mabus, J.R., Ferguson, C., Yan, Z., and Hornby, P.J. Alternative functional *in vitro* models of human intestinal epithelia. *Frontiers in Pharmacology*, 2013. 4: p. 1-18.
175. Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., Real, F.X., and Zweibaum, A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *Journal of Cell Science*, 1993. 106(3): p. 771-783.
176. de los Reyes-Gavilán, C.G., Suárez, A., Fernández-García, M., Margolles, A., Gueimonde, M., and Ruas-Madiedo, P. Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated *in vitro* using human gastric and duodenal juices. *Research in Microbiology*, 2011. 162(5): p. 514-519.
177. López, P., González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Ruas-Madiedo, P., Suárez, A., Margolles, A., and Gueimonde, M. Interaction of *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 with HT29 cells influences regulatory-T-cell-associated chemokine receptor expression. *Applied Environmental Microbiology*, 2012. 78(8): p. 2850-2057.
178. Payne, A.N., Zihler, A., Chassard, C., and Lacroix, C. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol*, 2012. 30(1): p. 17-25.
179. Tanoue, T., Nishitani, Y., Kanazawa, K., Hashimoto, T., and Mizuno, M. *In vitro* model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008. 374(3): p. 565-569.
180. Takisawa, R., Nishitani, Y., Mizuno, M., and Osawa, R. Anti-Inflammatory effect of *Bifidobacterium longum* on macrophage-like THP-1 cells via epithelial cell Caco-2. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2009. 28(2): p. 45-48.
181. Dertli, E., Mayer, M.J., and Narbad, A. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *BMC Microbiology*, 2015. 15(1): p. 1-9.
182. Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrene, Y., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional Analysis of the priming glycosyltransferase. *Applied Environmental Microbiology*, 2009. 75(11): p. 3554-3563.
183. Notararigo, S., de Las Casas-Engel, M., Fernández de Palencia, P., Corbí, A.L., and López, P. Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1-3)-beta-D-glucan from *P. parvulus* 2.6. *Carbohydrate Polymers*, 2014. 112: p. 109-113.
184. Fleige, S. and Pfaffl, M.W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006. 27(2-3): p. 126-139.
185. Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H.M., and Ma, T.Y. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability *in vitro* and *in vivo* by

- inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *American Journal of Pathology*, 2013. 182(2): p. 375-387.
186. Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., de Waal-Malefyt Rd, R., Bazan, F., Kastelein, R.A., and Liu, Y.J. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 2002. 3(7): p. 673-680.
 187. Sonnier, D., Bailey, S., Schuster, R., Lentsch, A., and Pritts, T. TNF- α induces vectorial secretion of IL-8 in Caco-2 cells. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2010. 14(10): p. 1592-1599.
 188. Abreu, M.T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L.S., Arnold, E.T., and Arditi, M. Decreased expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 2001. 167(3): p. 1609-1616.
 189. Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y., and Schneider, Y.-J. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicology in Vitro*, 2010. 24(5): p. 1441-1449.
 190. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Dore, J., Meta, H.I.T.C., Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariatz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Merieux, A., Melo Minardi, R., M'Rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Bork, P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011. 473(7346): p. 174-180.
 191. Boder, P. Influence of prebiotics on the human immune system (GALT). *Recent Patent on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2008. 2(2): p. 149-153.
 192. Kau, A.L., Ahern, P.P., Griffin, N.W., Goodman, A.L., and Gordon, J.I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 2011. 474(7351): p. 327-336.
 193. Taschuk, R. and Griebel, P.J. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Animal Health Research Review*, 2012. 13(1): p. 129-141.
 194. Rizzello, V., Bonaccorsi, I., Dongarra, M.L., Fink, L.N., and Ferlazzo, G. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by

- commensal bacteria probiotics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. 2011: p. 1-10.
195. Cerutti, A. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunology*, 2008. 1(1): p. 8-10.
 196. Knights, D., Lassen, K., and Xavier, R. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut*, 2013. 62: p. 1505 - 1510.
 197. Kamada, N., Seo, S.U., Chen, G.Y., and Nunez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Review Immunology*, 2013. 13(5): p. 321-335.
 198. Neurath, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Review Immunology*, 2014. 14(5): p. 329-342.
 199. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Review Immunology*, 2008. 8(6): p. 411-420.
 200. Vieira, A.T., Teixeira, M.M., and Martins, F.d.S. The role of probiotics and prebiotics inducing gut immunity. *Frontiers in Immunology*, 2013. 4(445): p. 1-12.
 201. Ewaschuk, J.B. and Dieleman, L.A. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2006. 12(37): p. 5941-5950.
 202. Geier, M.S., Butler, R.N., and Howarth, G.S. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 2007. 115(1): p. 1-11.
 203. Orel, R. and Kamhi Trop, T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2014. 20(33): p. 11505-11524.
 204. Marteau, P. and Seksik, P. Role of prebiotics and probiotics in therapeutic management of cryptogenetic inflammatory bowel disease. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 2001. 25(2 Pt 2): p. C94-97.
 205. Mitsuyama, K. Probiotics and prebiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nihon Rinsho*, 2005. 63(5): p. 850-858.
 206. Zhang, H., Sparks, J.B., Karyala, S.V., Settlege, R., and Luo, X.M. Host adaptive immunity alters gut microbiota. *ISME Journal*, 2015. 9(3): p. 770-781.
 207. Xie, J., Guo, L., Ruan, Y., Zhu, H., Wang, L., Zhou, L., Yun, X., and Gu, J. Laminarin-mediated targeting to Dectin-1 enhances antigen-specific immune responses. *Biochemical and Biophysics Research Communication*, 2010. 391(1): p. 958-692.
 208. Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 2011. 29(1): p. 54-66.
 209. Walsh, A.M., Sweeney, T., O'Shea, C.J., Doyle, N.D., and O'Doherty, J.V. Effects of supplementing dietary laminarin and fucoidan on intestinal morphology and the immune gene expression in the weaned pig. *Journal of Animal Science*, 2015. 2012(90): p. 284—286.

210. Devillé, C., Gharbi, M., Dandrifosse, G., and Peulen, O. Study on the effects of laminarin, a polysaccharide from seaweed, on gut characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007. 87(9): p. 1717-1725.
211. Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolín, M., de Lara, F., Espín, E., Naval, J., Guarner, F., and Malagelada, J.R. Increased mucosal tumour necrosis factor α production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut*, 2002. 51(5): p. 659-664.
212. Neurath, M.F., Finotto, S., and Glimcher, L.H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Medicine*, 2002. 8(6): p. 567-573.
213. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 2007. 35(4): p. 495-516.
214. Dannappel, M., Vlantis, K., Kumari, S., Polykratis, A., Kim, C., Wachsmuth, L., Eftychi, C., Lin, J., Corona, T., Hermance, N., Zelic, M., Kirsch, P., Basic, M., Bleich, A., Kelliher, M., and Pasparakis, M. RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis. *Nature*, 2014. 513(7516): p. 90-94.
215. Aggarwal, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Review Immunology*, 2003. 3(9): p. 745-576.
216. Boraschi, D. and Tagliabue, A. The interleukin-1 receptor family. *Vitamins & Hormones*, 2006. 74: p. 229-254.
217. Somasundaram, R., Nuij, V.J.A.A., van der Woude, C.J., Kuipers, E.J., Peppelenbosch, M.P., and Fuhler, G.M. Peripheral neutrophil functions and cell signalling in crohn's disease. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e84521.
218. Ansari, N., Abdulla, J., Zayyani, N., Brahmi, U., Taha, S., and Satir, A.A. Comparison of RANTES expression in Crohn's disease and ulcerative colitis: an aid in the differential diagnosis? *Journal of Clinical Pathology*, 2006. 59(10): p. 1066-1072.
219. Rescigno, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends in Immunology*, 2011. 32(6): p. 256-264.
220. Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunology Review*, 2009. 229(1): p. 152-172.
221. Hume, D.A. and MacDonald, K.P.A., Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling 2012.
222. Sartor, R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology*, 2006. 3(7): p. 390-407.
223. Cario, E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: A decade later. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010. 16(9): p. 1583-1597.
224. Heneghan, A.F., Pierre, J.F., and Kudsk, K.A. JAK-STAT and intestinal mucosal immunology. *JAK-STAT*, 2013. 2(4): p. e25530.
225. Broom, O.J., Widjaya, B., Troelsen, J., Olsen, J., and Nielsen, O.H. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clinical and Experimental Immunology*, 2009. 158(3): p. 272-280.

226. Karl, I., Jossberger-Werner, M., Schmidt, N., Horn, S., Goebeler, M., Leverkus, M., Wajant, H., and Giner, T. TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis. *Cell Death Disease*, 2014. 5: p. e1444.
227. Benedetti, G., Fokkelman, M., Yan, K., Fredriksson, L., Herpers, B., Meerman, J., van de Water, B., and de Graauw, M. The nuclear factor κ B family member RelB facilitates apoptosis of renal epithelial cells caused by cisplatin/tumor necrosis factor α synergy by suppressing an epithelial to mesenchymal transition-like phenotypic switch. *Molecular Pharmacology*, 2013. 84(1): p. 128-138.
228. Shanahan, F. Crohn's disease. *Lancet*, 2002. 359(9300): p. 62-69.
229. Takahashi, N., Vereecke, L., Bertrand, M.J.M., Duprez, L., Berger, S.B., Divert, T., Goncalves, A., Sze, M., Gilbert, B., Kourula, S., Goossens, V., Lefebvre, S., Gunther, C., Becker, C., Bertin, J., Gough, P.J., Declercq, W., van Loo, G., and Vandenabeele, P. RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis. *Nature*, 2014. 513(7516): p. 95-99.
230. Zarubin, T. and Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 2005. 15(1): p. 11-18.
231. Jiménez, N., Coll, J., Estepa, A., and Tafalla, C. Futuro de las vacunas ADN frente a virus en acuicultura. *Revista AquaTIC*, 2005(23): p. 20-35.
232. Rodríguez Saint-Jean, S., De las Heras, A., Carrillo, W., Recio, I., Ortiz-Delgado, J.B., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J.A., Sarasquete, C., and Pérez-Prieto, S.I. Antiviral activity of casein and alphas2 casein hydrolysates against the infectious haematopoietic necrosis virus, a rhabdovirus from salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 2013. 36(5): p. 467-481.
233. Cerini, C.P. and Malsberger, R.G. Morphology of infectious pancreatic necrosis virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1965. 126(1): p. 315-319.
234. Cohen, J., Poinard, A., and Scherrer, R. Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology*, 1973. 21: p. 485-498.
235. Roberts, R.J., Fish pathology 1989: Bailliere Tindall.
236. Rombout, J., Huttenhuis, H., Picchiatti, S., and Scapigliati, G. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004. 19(5): p. 441-455.
237. Tafalla, C., Bøggwald, J., and Dalmo, R.A. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013. 35(6): p. 1740-1750.
238. Leong, J.C., Anderson, E., Bootland, L.M., Chiou, P.W., Johnson, M., Kim, C., Mourich, D., and Trobridge, G. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Developments in Biological Standardization*, 1996. 90: p. 267-277.
239. Manoj, S., Babiuk, L.A., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. Approaches to enhance the efficacy of DNA vaccines. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2004.
240. Guy, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews: Microbiology*, 2007. 5(7): p. 505-517.

241. Ribeiro, C.M.S. and Schijns, V.E.J.C. Immunology of vaccine adjuvants. *Methods in Molecular Biology*, 2009. 626: p. 1-14.
242. Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., and Moran, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina*, 2011.
243. Graham, S. and Secombes, C.J. The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology*, 1988. 65: p. 293-297.
244. Renault, T., Torhy, C., and De Kinkelin, P. Spectrophotometric method for titration of trout interferon and its application of rainbow trout fry experimentally infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Disease of Aquatic Organisms*, 1991. 10: p. 23-29.
245. Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K., and Mukherjee, S.C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology Biochemistry*, 2013. 39(3): p. 431-457.
246. Cook, M.T., Hayball, P.J., Hutchinson, W., Nowak, B., and Hayball, J.D. The efficacy of a commercial beta-glucan preparation, EcoActiva, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. *Fish Shellfish Immunology*, 2001. 11(8): p. 661-672.
247. Whipple, M.J., Gannam, A.L., and Bartholomew, J.L. Inability to control ceratomyxosis in rainbow trout and steelhead with oral treatments of glucan immunostimulant or the fumagillin analog TNP-470. *North American Journal of Aquaculture*, 2002. 64(1): p. 1-9.
248. Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R., and Klesius, P.H. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* Challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007. 38(1): p. 24-35.
249. Robertsen, B. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunology*, 2006. 20(2): p. 172-191.
250. Vetvicka, V., Vannucci, L., and Sima, P. The effects of beta-glucan on fish immunity. *North American Journal of Medical Sciences*, 2013. 5(10): p. 580-588.
251. Kimmel, S.A. and Roberts, R.F. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food & Microbiology*, 1998. 40(1-2): p. 87-92.
252. Marshall, V.M., Cowie, E.N., and Moreton, R.S. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*, 1995. 62(04): p. 621-628.
253. van Maele, M.E. and Zoon, P. Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels. *Netherland Milk Dairy*, 1995. 49(1).
254. Levander, F., Svensson, M., and Radstrom, P. Small-scale analysis of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a semi-defined medium. *BMC Microbiology*, 2001. 1: p. 23.

255. Korakli, M., Rossmann, A., Ganzle, M.G., and Vogel, R.F. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 2001. 49(11): p. 5194-5200.
256. Volman, J.J., Helsper, J.P., Wei, S., Baars, J.J., van Griensven, L.J., Sonnenberg, A.S., Mensink, R.P., and Plat, J. Effects of mushroom-derived beta-glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor-kappaB transactivation in Caco-2 reporter cells: can effects be explained by structure? *Molecular Nutrition and Food Research*, 2010. 54(2): p. 268-276.
257. Stier, H., Ebbeskotte, V., and Gruenwald, J. Immune-modulatory effects of dietary yeast beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutrition Journal*, 2014. 13(1): p. 38.
258. Hynes, N.E. and Lane, H.A. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Review Cancer*, 2005. 5(5): p. 341-354.
259. Chang, Z.Q., Lee, J.-S., Gebru, E., Hong, J.H., Jung, H.K., Jo, W.S., and Park, S.C. Mechanism of macrophage activation induced by β -glucan produced from *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. 391(3): p. 1358-1362.
260. Kawata, K., Iwai, A., Muramatsu, D., Aoki, S., Uchiyama, H., Okabe, M., Hayakawa, S., Takaoka, A., and Miyazaki, T. Stimulation of macrophages with the β -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* promotes the secretion of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0124809.
261. Li, X., Wang, J., Wang, W., Liu, C., Sun, S., Gu, J., Wang, X., Boraschi, D., Huang, Y., and Qu, D. Immunomodulatory activity of a novel, synthetic beta-glucan (β -glu6) in murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*, 2013. 8(11): p. e80399.
262. Jackson, S.H., Yu, C.R., Mahdi, R.M., Ebong, S., and Egwuagu, C.E. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *The Journal of Immunology*, 2004. 172(4): p. 2307-2315.
263. Maharshak, N., Hart, G., Ron, E., Zelman, E., Sagiv, A., Arber, N., Brazowski, E., Margalit, R., Elinav, E., and Shachar, I. CCL2 (pM levels) as a therapeutic agent in inflammatory bowel disease models in mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010. 16(9): p. 1496-1504.
264. Dai, C., Jiang, M., and Sun, M.J. Innate immunity and adaptive immunity in Crohn's disease. *Annals of Translational Medicine*, 2015. 3(3): p. 34.
265. Park, E.K., Jung, H.S., Yang, H.I., Yoo, M.C., Kim, C., and Kim, K.S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, 2007. 56(1): p. 45-50.
266. Loftus Jr, E.V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 2004. 126(6): p. 1504-1517.
267. Claud, E.C., Savidge, T., and Walker, W.A. Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatric Research*, 2003. 53(3): p. 419-425.

268. Llopis, M., Antolín, M., Carol, M., Borrueal, N., Casellas, F., Martínez, C., Espín-Basany, E., Guarner, F., and Malagelada, J.R. *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009. 15(2): p. 275-283.
269. Lee, J.Y., Kim, Y.J., Kim, H.J., Kim, Y.S., and Park, W. Immunostimulatory effect of laminarin on RAW 264.7 mouse macrophages. *Molecules*, 2012. 17(5): p. 5404-5411.
270. Smith, A.G., O'Doherty, J.V., Reilly, P., Ryan, M.T., Bahar, B., and Sweeney, T. The effects of laminarin derived from *Laminaria digitata* on measurements of gut health: selected bacterial populations, intestinal fermentation, mucin gene expression and cytokine gene expression in the pig. *British Journal of Nutrition*, 2011. 105(05): p. 669-677.
271. Ravi, R. and Bedi, A. NF- κ B in cancer—a friend turned foe. *Drug Resistance Updates*, 2004. 7(1): p. 53-67.
272. Dalmo, R.A. and Bøggwald, J. β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008. 25(4): p. 384-396.
273. Kamilya, D., Maiti, T.K., Joardar, S.N., and Mal, B.C. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *Journal of Fish Diseases*, 2006. 29(6): p. 331-337.
274. Selvaraj, V., Sampath, K., and Sekar, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005. 19(4): p. 293-306.
275. Rørstad, G., Aasjord, P.M., and Robertsen, B. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 1993. 3(3): p. 179-190.
276. Jeney, G. and Anderson, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1993. 116(4): p. 315-329.
277. Ringø, E., Olsen, R.E., González-Vecino, J.L., Wadsworth, S., and Song, S.K. Use of Immunostimulants and Nucleotides in Aquaculture: A Review. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 2012. 1(104): p. 1-22.
278. Falco, A., Miest, J.J., Pionnier, N., Pietretti, D., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F., and Hoole, D. Beta-Glucan-supplemented diets increase poly(I:C)-induced gene expression of Mx, possibly via Tlr3-mediated recognition mechanism in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunology*, 2014. 36(2): p. 494-502.
279. Náchter-Vázquez, M., Ballesteros, N., Canales, A., Rodríguez Saint-Jean, S., Pérez-Prieto, S.I., Prieto, A., Aznar, R., and López, P. Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers*, 2015. 124: p. 292-301.

APÉNDICES

Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria

María Laura Werning¹, Sara Notararigo¹, Montserrat Náchér²,
Pilar Fernández de Palencia¹, Rosa Aznar^{2,3} and Paloma López¹

¹*Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones,
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC),*

²*Departamento de Biotecnología,
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC),*

³*Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València
Spain*

1. Introduction

Polysaccharides have been used traditionally by the food industry for their viscosifying, emulsifying and biothickening properties and more recently for manufacture of functional food due to their prebiotic and immunomodulating properties.

Bacteria can synthesize cytoplasmic storage polysaccharides (e.g. glycogen), cell wall structural polysaccharides such as peptidoglycan, and lipoteichoic acids of gram-positive bacteria, and the lipopolysaccharides anchored in the outer membrane of gram-negative bacteria. In addition, some bacteria can secrete polysaccharide layers on their surface, which together with a few glycoproteins, constitute the glycocalyx. These exocellular polymers comprise the capsular polysaccharides, which form a cohesive layer or capsule covalently linked to the cell surface, and the exopolysaccharides (EPS), which form a slime layer loosely attached to the cell surface or secreted into the environment (Brock, 2008). The physiological role of these molecules are not yet clearly understood, although it is generally recognized that exocellular polysaccharides are not normally used as energy and carbon sources by the producing microorganism. They can serve for a variety of functions including cell recognition and interaction, adherence to surfaces and biofilm formation.

The majority of the polysaccharides used as additives by the food industry such as pectin, cellulose and alginate are obtained from plants and algae. However, other biopolymers like xanthan and gellan, also used as bio-thickeners, are synthesized by gram-negative bacteria. Furthermore, lactic acid bacteria (LAB) producing EPS are used mainly in the dairy industry for improvement of the rheological properties of fermented products as well as for the manufacture of functional food.

The taste/texture benefits of the EPS produced by LAB in fermented foods are well established, because these organisms produce polymers that improve the rheological

properties of dairy products. When they are added to food, polysaccharides show functions as thickeners, stabilizers, emulsifiers, gelling agents, and water binding agents (Kimmel et al., 1998). They also contribute to preservation, and enhance the organoleptic characteristics of milk and dairy products such as flavour and aroma (Macedo et al., 2002). More recently, these bio-molecules have been regarded as health promoters due to their role as prebiotics and/or the immunomodulatory properties linked to their structure. As a result, a number of studies are in progress in order to characterize the unmapped diversity of the EPS produced by LAB, since they are considered food-grade organisms.

In this chapter, we shall review the current knowledge pertaining to the EPS synthesized by LAB, from biogenesis to application, detailing their nature and structure. Moreover, the methods most frequently used for the production and purification of these biopolymers will be presented.

2. Composition, structure and classification of EPS

The EPS synthesized by LAB vary greatly in their chemical composition, structure and molecular weight. According to their chemical composition, EPS are classified into heteropolysaccharides (HePS) and homopolysaccharides (HoPS).

HePS are constructed of a backbone of repeated subunits that are linear or branched, with variable molecular masses (up to 10^6 Da). Each one of these subunits can contain between three and eight different monosaccharides and frequently has a range of different linkage patterns. The monosaccharides are present as the α - or β -anomer in the pyranose or furanose form and D-glucose, D-galactose and L-rhamnose are the most frequently encountered. In few cases, N-acetylglucosamine, manose, fucose, glucuronic acid and non-carbohydrate substituents (phosphate, acetyl and glycerol) are also present (de Vuyst & Degeest, 1999; de Vuyst et al., 2001).

Different strains of LAB isolated from dairy products, cereals and alcoholic beverages synthesize HePS. These belong to the genera *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*), *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. sakei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*, *S. macedonicus*) and *Leuconostoc* (*Lc. mesenteroides*) (Monterisino et al., 2008; Mozzi et al., 2006; Van der Meulen et al., 2007).

HoPS are composed of repeated units that contain only one type of monosaccharide: D-glucopyranose (glucans) or D-fructopyranose (fructans). These polysaccharides usually display high molecular masses (up to 10^7 Da), and have different degrees and types of branching, linking sites and chain length. Based on their structure, the fructans can be divided into two groups: (i) inulins (linked β -2,1) and (ii) levans (linked β -2,6), both are synthesized by different species of the genera *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Weissella*.

Glucans can be classified into α - and β -D-glucans. The former are more widely found in LAB and they are produced by strains belonging to the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Streptococcus*. According to the linkages in the main chain, the α -glucans are subdivided into dextrans (α -1,6), mutans (α -1,3), glucans (α -1,2), reuterans (α -1,4) and alternans (α -1,3 and α -1,6) (Figure 1). These polymers may have side-chain branches that involve others α -linkages different from the main chain. For example, the dextrans produced by various LAB

such as *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacilli*, may have branches with α -1,2, α -1,3 or α -1,4 linkages. The dextran most widely used by the industry is a polysaccharide containing 95% α -1,6 and 5% α -1,3 linkages synthesized by *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F (Korakli & Vogel, 2006; Monsan et al., 2001; van Hijum et al., 2006).

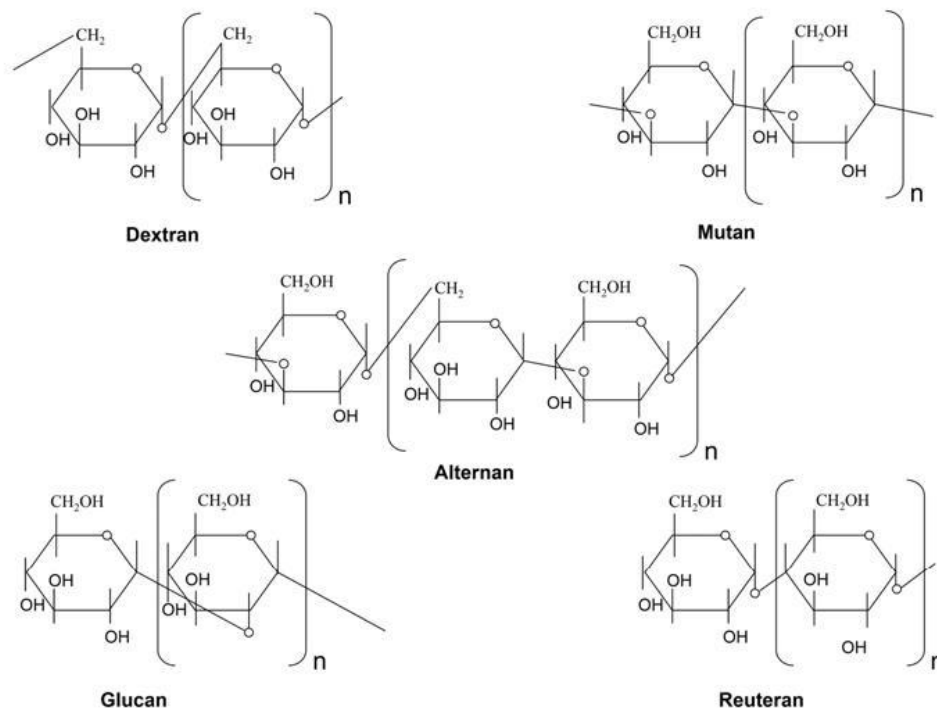


Fig. 1. Schematic representation of the repeating units of: dextran, mutan, alternan, glucan and reuteran (Korakli & Vogel, 2006)

(1,3) β -glucans are found in bacteria and eukaryotic organisms. These polysaccharides include the linear glucans and 6-substituted (1,3) β -glucans that have branch-on-branch or cyclic structures. Concerning prokaryotes, several bacteria including *Agrobacterium* and *Rhizobium* species can produce these polymers. One such structure, curdlan, has been approved as a food additive by the Food and Drug Administration (FDA), and essentially is a linear (1,3) β -D-glucan which may have a few inter- or intra-chain (1,6) linkages (McIntosh et al., 2005).

β -glucan production is rarely found in LAB. It has only been reported to be synthesized and secreted by a small number of strains isolated from alcoholic beverages, namely: *Pediococcus parvulus* IOEB8801 and *Oenococcus oeni* IOEB0205 from wine and *P. parvulus* 2.6R, CUPV1, CUPV22, *Lb. diolivorans* G77 and *O. oeni* I4 from cider (Dueñas-Chasco et al., 1997, 1998; Garai-Ibabe et al., 2010; Ibarburu et al., 2007; Llauberes et al., 1990).

In all cases, these β -D-glucans have a common structure comprising a main chain of (1,3)-linked β -D-glucopyranosyl units along with more or less frequent side chains of β -D-glucopyranosyl units attached by (1,2) linkages (Figure 2).

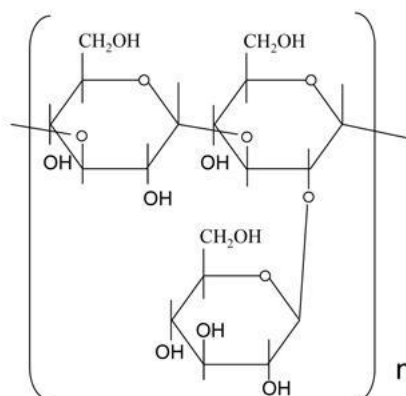


Fig. 2. Schematic representation of the repeating unit of β -(1,3,2)-D-glucan of *P. parvulus* 2.6 (Dueñas-Chasco et al., 1997)

In addition, a similar polymer constitutes the capsule of *S. pneumoniae* serotype 37 and the EPS secreted by *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *shermanii* TL34 (Adeyeye et al., 1988; Nordmark et al., 2005).

3. Biosynthesis of EPS

3.1 Genetic determinants and mechanisms of production and secretion

The genes involved in the biogenesis of the HePS are usually organized in clusters that can be located either in the chromosome of the thermophilic LAB (e. g. *S. thermophilus* Sfi6) or in plasmids of mesophilic bacteria (e.g. *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40) (Laws et al., 2001). This structural organization is highly conserved among LAB and is very similar to that observed for the operons and clusters involved in the synthesis of: (i) O-antigen lipopolysaccharides in enterobacteria, (ii) capsules (CPS) of pathogens, such as *S. pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* and (iii) the EPS from *Sinorhizobium meliloti* (García et al., 2000; Glucksmann et al., 1993; Lin et al., 1994).

The clusters from LAB have been reported for *S. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *L. lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. rhamnosus* and the *Lb. casei* group (Ruas-Madiedo et al, 2008). The genes are oriented in a single direction and transcribed as a single mRNA. The genes are grouped into four regions within the cluster: The first contains genes whose products are regulatory proteins; the second includes genes encoding proteins involved in polymerization/chain length determination; the third contains genes encoding enzymes required for the biosynthesis of the HePS repeating units, and the genes of the last region encode proteins implicated in transport and polymerization (Figure 3) (Jolly & Stingle, 2001).

Additionally, these clusters may occasionally include genes involved in biosynthesis of nucleotide sugars from which the repeating units are constructed. Thus, in *Lb. rhamnosus*, they are associated to the EPS operon and they can be transcribed either from their own promoter or together with the EPS operon genes (Péant et al., 2005). There is a great variability in the genes involved in the synthesis of the repeating units. This region is

responsible for the production of a specific EPS type; whereas the genes of polymerization and transport are more conserved.

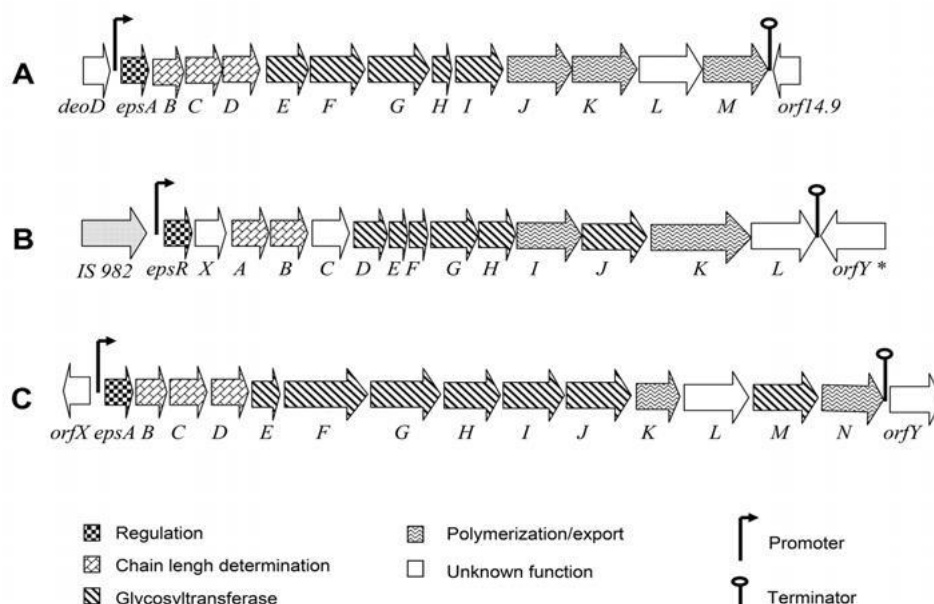


Fig. 3. Organization of the *eps* gene clusters of (A) *S. thermophilus* Sfi6, (B) *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and (C) *Lb. bulgaricus* Lfi5 (Lamothe et al., 2002; Laws et al., 2001). The proposed function of the different gene products is indicated

HePS are made by the polymerization of repeating unit precursors formed in the cytoplasm. They are assembled at the membrane by the sequential addition of nucleotide sugars (e.g., UDP-glucose, UDP-galactose and dTDP-rhamnose) or nucleoside diphosphate sugars to the growing repeated units through the action of the specific glycosyltransferases. This unit is most probably anchored to a lipid carrier molecule located in the plasma membrane and the first monosaccharide is linked by the action of a type of glycosyltransferase called priming-glycosyltransferase. It has been proposed that this lipid carrier might be an isoprenoid derivative such as undecaprenyl-phosphate (C55-P) by analogy with the synthesis of other EPS of gram-negative bacteria, as well as in the assembly of peptidoglycan, lipoteichoic acids and O-antigen lipopolysaccharides (Ruas-Madiedo et al., 2009). However some studies based in the resistance to bacitracin (a compound that blocks the transformation of the C55-PP to C55-P), suggested that HePS biosynthesis in *S. thermophilus* Sfi6 uses a lipid carrier different from undecaprenyl carrier (Stingle et al., 1999).

The mechanisms of polymerization, chain length determination and export still remain poorly understood. However, the similarity of gene products involved in these processes to those participating in the polymerization and export of O-antigens from *Escherichia coli* and the EPS of *S. meliloti*, suggests that probably LAB utilize similar mechanisms for polymerization and export of EPS. Thus, an enzyme of the flipase family could transfer the lipid-bound repeating units from the cytoplasmic face of the membrane to the external face.

Using the same line of argument, a polymerase could catalyze the linking of the repeating units and an enzyme could uncouple the lipid-bound polymer and control chain length (Laws et al., 2001).

The regulatory mechanisms involved in expression of the HePS genes remain unclear. However, a transcriptional regulatory role has been proposed for a group of gene products in different LAB genera, due to their similarity with a family of transcriptional regulators whose prototype is LytR, the regulator of the autolysin operon of *Bacillus subtilis* (Ruas-Madiedo et al., 2009).

Finally, a variety of nucleotide sugars is needed for the synthesis of a range of polysaccharides which is not specific to EPS biosynthesis. The production of these precursors occurs in the cytoplasm, mainly from glucose 1-P which is synthesized from glucose 6-P. These two forms of phosphorylated glucose are part of the central metabolism of the bacterium, which begins with the transport of sugar to the interior of the cell (de Vuyst et al., 2001).

Concerning to HoPS, most of them (α -glucans and fructans) are synthesized from sucrose through the action of extracellular enzymes commonly named glycansucrases. Enzymes synthesizing α -glucan polymers are limited to LAB, while enzymes synthesizing fructans, are present in other gram-positive and gram-negative bacteria. A large number of these glycansucrase encoding genes have been identified in the chromosomes of *Streptococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* strains and they usually form part of a monocistronic transcriptional unit. Some of these genes are expressed constitutively whilst other are sucrose-inducible (Gänzle & Schwab, 2009; van Hijum et al., 2006).

Only one gene, named *gtf*, is required for the β -glucan biosynthesis in LAB. This gene is located in a 35 kb plasmid of *P. parvulus* 2.6 or in a 5.5 kb plasmid of *P. parvulus* IOEB8801, CUPV1, CUPV22, *Lb. diolivorans* G77 and *Lb. suebicus* CUPV221, while *gtf* is located in the chromosome of *Oenococcus oeni* I4 and IOEB0205 (Dols-Lafargue et al., 2008; Garai-Ibabe et al., 2010; Walling et al., 2001; Werning et al., 2006). All of these bacteria produced the same 2-substituted (1,3)- β -D-glucan and their *gtf* genes show high level of homology (at least 97%).

The *gtf* gene encodes a β -glycosyltransferase (GTF). It is a membrane protein whose topological prediction indicates that β -glucan or, at least its repeating unit precursors, are synthesized in the cytosol (Werning et al., 2006). In agreement, *in vitro* experiments indicate that the β -glucan polymer is synthesized by GTF directly from UDP-glucose (Werning et al., 2008) which, as mentioned above, is part of the central metabolism of the bacterium and is available within the cell. The translocation through the membrane is performed by a mechanism that is not yet known. The fact that heterologous expression of GTF in other LAB leads to the synthesis and secretion of β -glucan in the recipient bacteria, strongly suggests that this polymer does not require specific transporters to be released into the extracellular space (Stack et al., 2010; Werning et al., 2008). Supporting this hypothesis, the capsular 2-substituted (1,3)- β -glucan of *S. pneumoniae* serotype 37, is synthesized by a single β -glycosyltransferase called Tts (which shares a 33% identity with GTF), and its heterologous expression in other gram-positive bacteria, also result in the capsular EPS formation (Llull et al., 2001).

The presence of four potential transmembrane regions at the C-terminal region of GTF glycosyltransferase and two more at its N-terminus suggest the formation of a membrane pore by the enzyme to facilitate the extrusion of the polymer (Werning et al., 2006). In this regard, there is experimental evidence (Helderman et al., 2001; Tlapak-Simons et al., 1998, 1999) suggesting that in the HAS glycosyltransferase from *S. pyogenes* only four transmembrane domains and two membrane-associated regions are sufficient to interact with the membrane phospholipids and to create a pore-like structure through which a nascent hyaluronan chain can be extruded to the extracellular environment. A similar mechanism could happen in the translocation of curdlan through the *Agrobacterium* membrane, for which it has been proposed that a pore could be formed by interaction of the CrdS synthase with phosphatidylethanolamine (Karnezis et al., 2003). Thus, the association of several GTF monomers could form a pore for extrusion of the EPS and, that might promote the processive catalysis of GTF carried out by this enzyme. However other alternative mechanisms might allow the translocation or secretion of β -glucan across LAB membranes. This includes the use of an ABC-like transporter, since this class of transporter can export various bacterial polysaccharides (Silver et al., 2001).

Finally, it should be noted that the presence of mobile genetic elements is a common feature in the genetic organization of the DNA region involved in HePS or HoPS synthesis (Bourgoin et al., 1999; Dabour & LaPointe, 2005; Peant et al., 2005; Tieking et al., 2005; van Hijum et al., 2004). It is well known that these elements allow horizontal transfer between different genera. In this regard, its presence could explain the instability of the HePS-producer phenotype of some strains (Ruas-Madiedo et al., 2009) as well as the loss of expression of some glucansucrases or the presence of chimeras in different HoPS-producing strains (Gänzle & Schwab, 2009). The *gtf* genes of LAB are flanked by genes which could be involved in functions of conjugation and recombination, respectively (Werning et al., 2006; Dols-Lafargue et al., 2008). Thus, horizontal transfer mediated by plasmids or transposition events, might explain the wide distribution and high degree of *gtf* gene preservation in β -glucan-producing strains belonging to different genera.

3.2 Enzymes for production

HePS and β -glucans are produced by glycosyltransferases which use nucleotide sugars as substrate. On the other hand, α -glucans and fructans are synthesized by glucansucrases which are able to use the energy of the glycosidic bond of sucrose to ligate glucose or fructose to the growing polysaccharide chain. In addition, these enzymes can synthesize hetero-oligosaccharides, when the acceptors are maltose and isomaltose (Monsan et al., 2001).

Enzymes synthesizing α -glucan polymers are called glucansucrases (GS) and those synthesizing fructans are named fructansucrases (FS). Unlike the glycosyltransferases (discussed below), GS and FS are transglycosidases evolutionarily, structurally, and mechanistically related to the glycosyl-hydrolases (GH). Therefore, according to the classification of the GH into families (which is based on the amino acid sequences) GS and FS can be respectively placed within the GH70 and the GH68 families (Henrissat & Bairoch, 1996). In addition, according to the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), GS enzymes are classified (according to the reaction they catalyze and the type of product) into: (i) dextransucrases (E.C.2.4.1.5) and (ii)

alternansucrases (E.C.2.4.1.140). The mutansucrases and reuteransucrases are classified together with the dextransucrase enzymes. Also, FS enzymes can be classified, based on the different products synthesized, into: (i) inulosucrases (E.C.2.4.1.9) and (ii) levansucrases (E.C.2.4.1.10) (van Hijum et al., 2006).

Although GS and FS enzymes perform very similar reactions on the same substrate, they do not show great similarities in their amino acid sequence and strongly differ in their protein structures. Regarding the amino acid sequence, these enzymes are composed of 4 structural domains from the N to the C terminus: (i) a signal peptide involved in the secretion of the enzyme; (ii) a variable N-terminal domain of unknown function; (iii) a conserved catalytic domain comprising sucrose-binding and sucrose-cleaving domain and in FS also a calcium ion binding site and (iv) a C-terminal domain, that is composed of a series of tandem repeats which is thought to be involved in the control of product size as well as in α -glucan binding (GS), or in cell wall anchoring (FS) (Korakli & Vogel, 2006).

The mechanism of action of GS is still not fully understood. The key step in the transfer of D-glucosyl units is the formation of a covalent glucosyl-enzyme intermediate, in which an amino acid triad, composed of two aspartate and one glutamate residues, is involved. From this intermediate, the glucosyl unit is transferred to the acceptor (the polymer in growth) by a processive catalytic mechanism. The overall synthesis can be described as three steps: initiation, elongation and termination. The last corresponds to the dissociation of the α -glucan-enzyme complex. Regarding the elongation, this can proceed by two alternative mechanisms, one acts at the reducing end and the other at the non-reducing end of the growing α -glucan chain (Monchois et al., 1999; Monsan et al., 2001).

So far little is known about the mechanism of action of the FS enzymes. Fructan biosynthesis could be carried out by a multiple elongation mechanism, where the fructose residues are added to the growing fructan chain. The catalytic mechanism proposed for the transfructosylation reaction occurs in two steps, involving both a nucleophilic and an acidophilic site, through the formation of a covalently linked intermediary fructosyl-enzyme (Monsan et al., 2001; Sinnott, 1991).

The glycosyltransferases are ubiquitous enzymes in prokaryotes and eukaryotes. They are involved in the biosynthesis of oligosaccharides, polysaccharides and glyconjugates (e.g. lipopolysaccharides and glycoproteins). These enzymes are responsible for the biosynthesis of glycosidic bonds by the transfer of a sugar residue from activated donor molecules to specific acceptor molecules. Donor sugar substrates are mostly nucleotide sugars; however they can also be nucleoside monophosphate sugars, lipid phosphate sugars and sugar 1-phosphate. Frequently the acceptors are other sugars but they can be lipids, nucleic acids, antibiotics, etc. Additionally, two stereochemical outcom

thermophilus Sfi6 and EpsD a phospho-glucosyltransferase from *L. lactis* subsp. *cremoris* B40, which are priming-glycosyltransferases. Examples of other glycosyltransferases are: EpsG, an N-acetyl-glucosaminetransferase from *S. thermophilus* Sfi6, which transfers N-acetylglucosamine to a β -galactose precursor anchored to a carrier lipid or EpsG, that catalyzes the linkage of galactose to a cellobiose precursor anchored to a carrier lipid from *L. lactis* subsp. *cremoris* (Ruas-Madiedo et al., 2009).

As mentioned above, the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan biosynthesis of *P. parvulus* 2.6 is carried out by the GTF glucosyltransferase. GTF was overproduced in *L. lactis* NZ9000 and purified as a membrane-associated enzyme (Werning et al., 2008). These membrane preparations used UDP-glucose as donor substrate to catalyze the biosynthesis of a high molecular weight polysaccharide that corresponds to the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan (Werning et al., 2008 and unpublished results). The acceptor is so far unknown, but it could be the growing β -glucan polymer or any lipid molecule present in the cellular membranes.

Traditionally, glycosyltransferases have been classified on the basis of their donor, acceptor and product specificity according to the recommendations of the IUBMB. However, this system requires full characterization before an Enzyme Commission (EC) number can be assigned. To overcome this limitation, these enzymes have been classified into families on the basis of amino acid sequence similarities as in the case of GH. At present there are already 91 families (referred to as GTx), available at URL: http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html. This classification is periodically reviewed and updated (Coutinho et al., 2003).

According to protein sequence similarity, enzymes that produce HePS can be grouped into various families. With regard to HoPS, the dextransucrases have been included in the family of glycosyl hydrolases GH70. In addition, GTF belongs to the GT-2 family that includes other glycosyltransferases such as cellulose synthases, β -1,3 glucan synthases, chitinsynthases, HAS and β -glucosyltransferases. All of these enzymes have in common that they use a nucleotide sugar as substrate for the synthesis of a polymer, with inversion of anomeric configuration of the donor substrate.

Two general three-dimensional (3D) folding models, called GT-A and GT-B have been observed for all the structures of nucleotide-sugar-dependent glycosyltransferases solved to date, and two mechanisms for retaining or inverting enzymes can be proposed within both classes. The GT-A fold may be considered as two tightly associated and abutting $\beta/\alpha/\beta$ Rossmann domains that tend to form a continuous central sheet of at least eight β -strands. The GT-B fold consists of two $\beta/\alpha/\beta$ Rossmann domains that face each other and are linked flexibly. These domains correspond to the donor substrate and acceptor binding sites (Breton et al., 2006; Lairson et al., 2008).

So far, no 3D-structure has been resolved for any glycosyltransferase involved in EPS synthesis from LAB, which would be essential for a better understanding of the mode of action of these enzymes. However, using the GT classification system proposed by Coutinho et al (2003) (in which families can be classified into clans on the basis of their folding and stereochemical outcome of the reaction that they catalyze) it is possible to predict that the glycosyltransferases can adopt one of two possible foldings. Thus, GTF from *P. parvulus* 2.6 belongs to the inverting-clan I of GT-A glycosyltransferases. A 3D-dimensional model based on the sequence of the putative active domain of GTF was built using as template the

experimentally resolved structures of SpsA synthase from *Bacillus subtilis* (PDB code 1qgq) and of a putative glycosyltransferase from *Bacteroides fragilis* (PDB code 3bcv). The model proposed for GTF corresponds to a GT-A fold, which consists of an open twisted β -sheet surrounded by α -helices on both sides, where the N- and C-terminus domains are respectively the donor substrate and the acceptor binding sites (Figure 4).

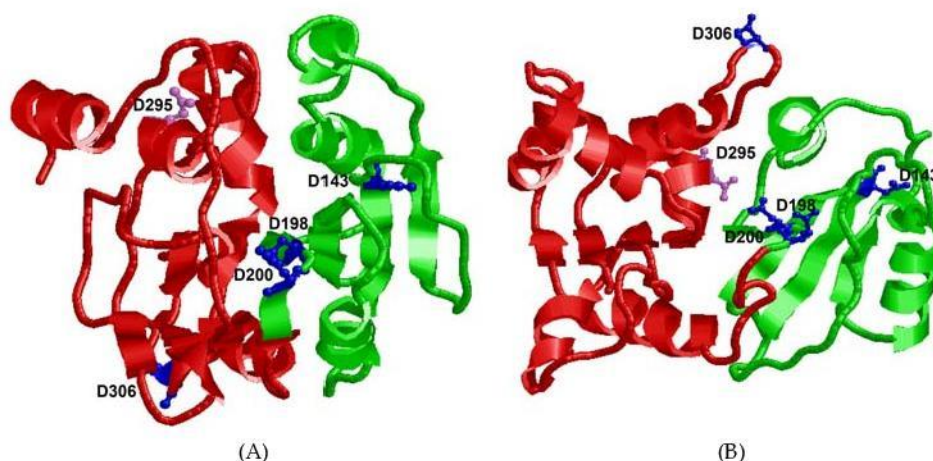


Fig. 4. Three-dimensional model for the putative active site of GTF constructed using resolved structures of SpsA from *B. subtilis* (A) and a putative glycosyltransferase from *Bc. fragilis* (B). The conserved N-terminal nucleotide-binding domain is shown in green and the C-terminal acceptor domain in red. The ball-and-stick representations show putative residues involved in the catalytic center: D143, D198 and D200 at the N-terminal domain and D306 at the C-terminal domain (in blue) as well as D295 (in violet), which is an alternative residue to D306, whose putative functions are discussed in the text

Based on structural data and on site directed mutagenesis experiments, it has been proposed that only four aspartic or carboxylate groups are required to form a single catalytic center of GT-A inverting enzymes (Charnock et al., 2001; Garinot-Schneider et al., 2000; Keenleyside et al., 2001; Tarbouriech et al., 2001). Three Asp located at the N-terminus domain are involved in nucleoside diphosphate (NDP) coordination. The first Asp residue is implicated in the recognition of uracil or thymine base. The other two, commonly referred to as DXD motif, bind to hydroxyl groups on the ribose moiety and the divalent metal ion (Mg^{2+} or Mn^{2+}), which in turn coordinate the phosphate groups from NDP, facilitating the release of the NDP from the donor substrate. A fourth residue, Asp or Glu, in the acceptor domain (C-terminus) acts at the catalytic site by activating the acceptor hydroxyl group, which would subsequently perform a nucleophilic attack on the C1 of the donor substrate (Lairson et al., 2008).

Candidate aspartate residues exist in GTF and it is possible to predict their location in the active site of this protein based on the 3D-structural model shown in Figure 4. Three aspartates (D143, D198 and D200) are coincident with those conserved and proposed in other glycosyltransferases from the GT-2 family, including glycosyltransferase SpsA of *B. subtilis*. The fourth aspartate (D306) is not a good candidate to be part of the active site

according to the current models and one alternative could be that at D295, though this should be evaluated by substrate docking experiments and site directed mutagenesis.

4. Production, purification and analysis of EPS

4.1 Methods of production

Most LAB species show low yields of polysaccharide production which is the main reason for their lack of commercial exploitation. Generally (with a few exceptions) the yield of production is under 1 g L⁻¹ for HoPS, when culture conditions are not optimized, and even less for the majority of the HePS. Van der Meulen et al. (2007) reported the EPS production by 10 LAB strains isolated from dairy and cereal products. Nine out of ten produced glucans in amounts from 0.8 to 1.7 g L⁻¹. The only HePS producer was *Lb. curvatus*, which synthesized the EPS to levels of 22 mg L⁻¹. Mozzi et al. (2006) reported that 31 HePS producers screened from 201 LAB strains (including thermophilic and mesophilic species) synthesized from 10 to 166 mg L⁻¹. Only seven of them produced > 100 mg L⁻¹.

Efforts have been made to improve yields of EPS production by LAB resulting in a variety of methods well detailed in the literature. All of them focus on parameters that have a strong influence on the production of HoPS and HePS. As a general rule the amount and composition of the EPS produced by LAB is strongly influenced by the culture and fermentation conditions such as pH, temperature and medium composition (Dueñas et al., 2003).

The production of α -glucans by LAB can be obtained in the presence of sucrose, after optimization of sucrose concentration in the growth medium and the time of incubation. The depletion of the sucrose source would cause the arrest of the enzymatic reaction of the dextransucrases. It has been reported that high producers of dextran are primarily *Leuconostoc*, but many other strains of LAB are able to produce this bacterial polysaccharide (Sarwat et al., 2008). The importance of improving its production is related to the industrial applications in the food, pharmaceutical and chemical industries as adjuvant, emulsifier, carrier or stabilizer (Goulas et al., 2004). *Lc. mesenteroides* CMG713 produces the highest concentration of dextran after 20 hours of incubation at 30°C in the presence of 15% sucrose at pH 7.0, with an EPS yield of 6 g L⁻¹ (Sarwat et al., 2008). Recently, Capek et al. (2011) reported an exceptionally high production of this HoPS (50 g L⁻¹) by *Lc. garlicum* PR.

On the contrary, β -glucan production is very tedious, because of the low yield obtained. Therefore, it demands new strategies to improve synthesis apart from the optimization of growth parameters. For production of the 2-substituted (1,3) β -glucan heterologous gene expression has been tested. A plasmid, pNGTF, was constructed in order to express the *P. parvulus* *gtf* in *L. lactis* NZ9000. This plasmid allows inducible expression of the *gtf* gene from the *nisA* gene promoter by the addition of nisin to the growth medium (Werning et al., 2008). The EPS released to the medium by NZ9000[pNGTF] was quantified and purified. The expression of GTF glycosyltransferase by NZ9000[pNGTF] yielded levels of purified EPS of 300 mg L⁻¹, when the bacteria was grown in batch conditions (Werning et al., 2008). The structural characterization of the purified EPS confirmed that the recombinant strain synthesizes and secretes the same 2-substituted (1,3)- β -D-glucan as *P. parvulus* 2.6 (Werning et al., 2008). The synthesis of the EPS was still not very high, but it could probably be

improved by optimizing growth conditions of the producing recombinant strain in continuous culture in a chemostat at controlled pH.

With regard to HePS, their production has been improved in the native isolates by optimizing growth conditions and media composition. As an example, Vijayendra and Babu (2008) optimized the EPS production by *Leuconostoc* sp. CFR-2181, a strain isolated from dahi, an Indian traditional fermented dairy product, in a simple, low cost semisynthetic medium. Maximum biomass and HePS production was observed when sucrose was used as carbon source and a yield of 30 g L⁻¹ of the biopolymer was obtained, although the concentration was estimated by dry weight and purity of the HePS was not assayed. As an alternative, to improve production of HePS, the *eps* clusters of various LAB have been overexpressed, mainly in *L. lactis*, by construction of recombinant strains carrying the genes in multicopy plasmids (e.g. the HePS of *S. thermophilus* Sfi39). In addition, metabolic engineering of *L. lactis* has been used to redirect carbon distribution between glycolysis and nucleotide sugar biosynthesis, with the aim of increasing intracellular levels of UDP-glucose, UDP-galactose and UDP-rhamnose, the substrates of the glycosyltransferases encoded by plasmid pNZ4000 and involved in HePS biosynthesis in the NIZO B40 strain (Boels et al., 2002).

The importance that EPS has gained in the food industries has been responsible for the development of other strategies to improve the total amount produced. Some good examples are their *in situ* production in food matrices and their *in vitro* production by the use of immobilized enzymes.

LAB can produce a large variety EPS during elaboration of dairy products. Since the use of LAB is historically considered safe (GRAS microorganisms), production *in situ* of novel functional EPS means that toxicological testing will be reduced, or not required, and the products can be quickly brought to the market (De Vuyst et al., 1999).

Yogurt is a well-known dairy product derived from milk fermentation by cultures producing EPS (e.g. *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* produce, respectively, 60-150 mg L⁻¹ and 30-890 mg L⁻¹ of HePS) (Marshall and Rawson, 1999). The use of EPS-producing starter cultures for yogurt elaboration is increasing, because these biopolymers improve water retention and texture and confer thickness without altering the organoleptic characteristics of the final product. Thus, there is no need to add stabilizers, many of which are prohibited in a wide range of countries. Although the role of pure EPS has not been studied, authors agree that the key points of improving the texture are the conformation of the EPS and their interactions with casein (Badel et al., 2011).

In the cheese making process strains such as *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* and *Lb. casei*, produce HePS. These polysaccharides, as occurs in yogurt, help to improve the rheological properties of the cheese. Their role in cheese elaboration depends on associations with other strains and also on the presence or absence of charges in the EPS produced (Badel et al., 2011).

Furthermore, there are other examples of *in situ* EPS production, such as kefir. This is a very important beverage in Eastern European countries. It is a fermented milk product produced by a population of different species of bacteria and yeasts. Several functional properties of kefir, such as its ability to modulate immune responses, to diminish allergic reactions and to inhibit tumour growth have been postulated for this beverage (Liu et al., 2002). LAB

produce lactic acid and yeast synthesize ethanol, which is used by *Lb. kefiranoferiens* to produce kefiran, a polysaccharide resistant to enzymatic degradation. Kefiran is a natural biopolymer that could be used as a thickener in fermented products.

Finally, the use of enzymes for the *in vitro* synthesis of polysaccharides is showing promise. Immobilized enzymes are preferred as this allows the recovery and reuse of the enzyme, and may improve the properties of the enzyme such as stability, activity, specificity and selectivity (Mateo et al., 2007). The technique is used for production of isomaltooligosaccharides by immobilized dextranase. Isomaltooligosaccharides are oligosaccharides with prebiotic activity that can be produced either by acceptor reactions of dextranase or hydrolysis of dextran by dextranase. In the case of dextranase, it can also produce leucrose (a disaccharide used as sweetener). Other uses are also currently being developed e.g. immobilization of β -galactosidase to produce galactooligosaccharides. Concerning immobilization technology, the alginate encapsulation method has the best performance, rendering yields of up to 90% (Tanriseven & Dogan, 2002). Dextranase has been immobilized on various supports including glutaraldehyde-activated chitosan, porous glass, bentonite and the commercially available matrix, Eupergit C, with high yield (90%) (Aslan & Tanriseven, 2007). Dextranase and dextranase share the optimum pH (pH 5.4) which facilitates their combined use. However, few studies using co-immobilization of dextranase and dextranase are yet available (Erhardt et al., 2008; Olcer & Tanriseven, 2010).

4.2 Methods of purification and characterization of EPS

Purification is the physical separation of a chemical substance of interest from contaminating substances. In the case of EPS, purification from bacterial culture supernatants means elimination of producer microorganisms and their secreted metabolites as well as components of the growth media. Ruas-Madiedo et al. (2005) extensively reviewed this subject, thus we shall present here only an overview of the more usual procedures, with a more detailed description of methods related to the determination of EPS structure.

The first step of purification of EPS depends on the bacterial growth medium utilized for its production. In complex media or in food matrix, such as milk, the first requirement is the elimination of proteins. For their removal a precipitation with TCA as well as treatment with proteases are the most commonly used methods. Then, the supernatant as well as the supernatant of bacterial cultures grown in defined media are usually subjected to one or more cycles of precipitation with either ethanol or acetone. The biopolymers present in the supernatants, if they are soluble, are dissolved in water, and then dialysed to remove the low molecular weight contaminants, in general a membrane with a cut-off of MWCO 12-14.000 Da is used.

After lyophilisation of the samples, the EPS is often further purified using a chromatographic technique. The parameters involved in the choice of the appropriate chromatography are: charge, solubility and molecular weight of the EPS. Size-exclusion chromatography (SEC) is a chromatographic method in which molecules in solution are separated by their size, not by molecular weight. It is usually applied to large molecules or macromolecular complexes. Another example is ion-exchange chromatography, which

allows the separation of ions and polar molecules based on their charge. In general the procedure involves passing a mixture dissolved in a mobile phase through a stationary phase. For high molecular weight polysaccharides, such as the 2-substituted (1,3)- β -glucan, SEC is the most suitable method, because the charge of the EPS is zero. In this case, dried EPS are dissolved in 0.3 M NaOH (to eliminate extra contaminants and to improve the solubility of the EPS) and centrifuged to eliminate insoluble material. The supernatant is loaded into a column of Sepharose CL-6B equilibrated with NaOH, which is also used as eluent. Fractions are collected, and monitored for carbohydrate content by the phenol-sulphuric method (Dubois et al., 1956).

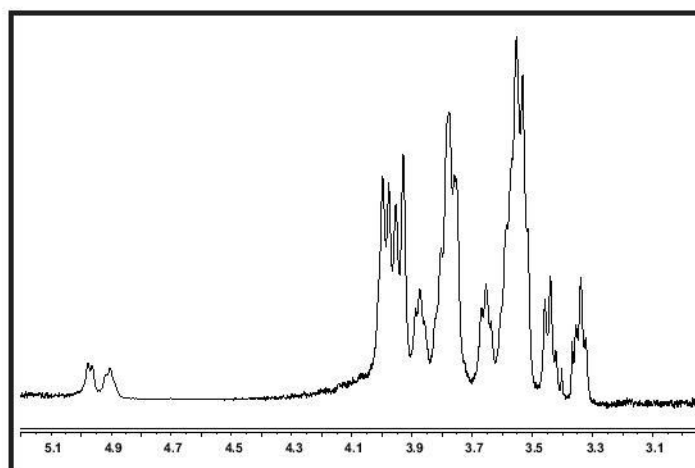
Polysaccharides are polydisperse polymers, and consequently only an apparent average molecular weight (M_w) can be determined. To this end, the average M_w can be estimated after SEC fractionation. A calibration curve is performed by fractionation of standards (Dextran Blue, T70, T10, and vitamin B12) and used for the determination of the M_w . As an alternative, high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) equipped with multi-angle laser-light scattering (MALLS) and refractive index (RI) detectors can be used to determine (M_w) and z-average radius of gyration (R_z) of the EPS.

To determine the monosaccharide composition of the EPS, the analysis of neutral sugars is performed by polysaccharide hydrolysis with 3M TFA. The resulting monosaccharides are converted into their corresponding alditol acetates by reduction with NaBH₄ and subsequent acetylation (Laine et al., 1972). Identification and quantification is performed by gas-liquid chromatography (GLC) using a HP5 fused silica column, with a temperature program and a flame ionization detector. With this technique the chromatogram shows only one peak per each monosaccharide, leading to an easy identification of the monosaccharide composition. However, if the polysaccharide contains uronic acid(s) it must be subjected to methanolysis after the hydrolysis. An *O*-methyl glycoside is formed, the acid function is transformed into an ester group and the sugar derivative can then be acetylated and analyzed by GLC.

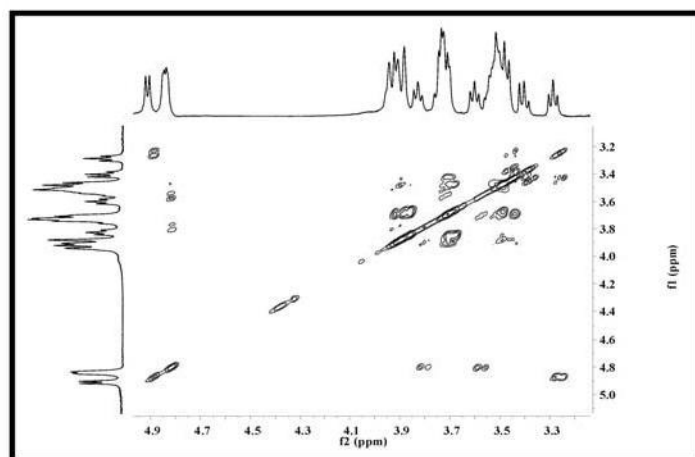
To determine the type of bond between each residue present in the EPS molecule a methylation analysis is usually performed. The polysaccharides are methylated according to the method of Ciucanu and Kerek (1984). The partially methylated polysaccharides are hydrolyzed with 3M TFA and the products are reduced with NaBD₄, acetylated and analyzed by gas chromatography/mass spectroscopy (GC-MS) (Leal et al., 2008). Each peak of the chromatogram is identified by the retention time and mass spectra parameters. The quantification is associated to the peaks area.

To resolve the 3D-structure of an EPS molecule, both the ring size (pyranose/furanose) of the monosaccharide residues and the relative orientations of the adjacent monosaccharides have to be determined. Nuclear magnetic resonance (NMR) is the technique most often used to study the conformation of the polysaccharides and allows elucidation of the type of glycosidic linkages and the structure of the repeating units that constitute the EPS molecules (review by Duus et al., 2000). Before NMR analysis, the purified EPS is dissolved in D₂O so that exchangeable protons are replaced by deuterium (deuteration). This procedure is repeated several times and may involve intermediate lyophilisation steps. A ¹H NMR spectrum of the EPS gives information about the number of monosaccharides present in the repeating unit by counting the resonances in the anomeric region (4.4-5.5 ppm). The

common hexoses are detected as well in ^{13}C NMR spectra (95-110 ppm). If there are resonances just downfield of 1 ppm in the ^1H NMR spectrum it is a sign of CH_3 -groups of e.g. a fucose or a rhamnose residue. Resonances close to 2 ppm reveal *N*-acetyl and/or *O*-acetyl functionalities. From the splitting of the anomeric peaks in ^1H spectra ($J_{\text{H1,H2}}$) the anomeric configuration can be established; a *J*-coupling of ~ 4 Hz indicates the α -configuration and a value of ~ 8 Hz indicates the β -form for common monosaccharides like D-glucopyranose and D-galactopyranose. The corresponding values of $J_{\text{C1,H1}}$ are ~ 170 -175 Hz for the α -form and ~ 160 -165 Hz for the β -form obtained from a coupled ^{13}C NMR analysis. Since most polysaccharide NMR spectra show peak overlap in the ring region



(A)



(B)

Fig. 5. NMR analysis of the purified the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan. ^1H -NMR (A) and ^1H , ^1H -COSY (B) spectra are depicted

(δ_H 3.1-4.4), 2D-NMR techniques are often applied. The proton chemical shifts are linked to their respective carbon by a 1H , ^{13}C -HSQC NMR analysis or, when the resonances in the ^{13}C dimension overlap too much, a ^{13}C , 1H -HETCOR NMR analysis is performed. To distinguish methylene protons (CH_2) from methyl (CH_3) and methine (CH), a multiplicity-edited 1H , ^{13}C -HSQC analysis can be used. The protons in each spin system can be assigned using 1H , 1H -TOCSY and/or 1H , 1H -DQF-COSY analysis, both techniques allow the magnetization to travel over bonds with the help of J -couplings and thereby connecting the protons. EPS contain protons and carbons, but sometimes also nitrogen and even phosphorus. Their respective chemical shifts can be assigned and correlated to 1H using e.g. 1H , ^{15}N -HSQC and 1H , ^{31}P -TOCSY analysis. The exchangeable amide protons, measured in a H_2O - D_2O mixture, have J -couplings to the ring protons and can be assigned correctly in the ring by a 1H , 1H -TOCSY with water suppression. As an example, the uni- and bi-dimensional NMR analysis of the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan is depicted in Figure 5. The 1D-NMR spectrum (Fig. 5A) revealed several peaks in the region between 3.2 and 4.1 ppm and 2 peaks in the anomeric region characteristics of this type of polysaccharide. 2D-COSY analysis (Fig. 5B) showed couplings between anomeric protons and C2 protons (H_{1C}/H_{2C} , H_{1B}/H_{2B} y H_{1A}/H_{2A}) characteristic of the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan.

Finally, to determine the supramolecular structure and conformation of an EPS, atomic force microscopy (AFM) is currently used. It has been successfully applied to visualize a range of polysaccharides including curdlan (Ikeda & Shishido, 2005), and oat β -glucan (Wu et al., 2006). The (1,3)- β -D-glucan helices dissociate into random coils when the strength of the bonds keeping the helix together are decreased below a critical limit. The helix-coil transition is referred to as denaturation (Sletmoen & Stokke, 2008). Denaturation of (1,3)- β -D-glucan triplexes occurs in alkaline solutions or in dimethyl sulfoxide. In alkaline solutions due to the ionization of the hydroxyl groups and the subsequent electrostatic repulsion between chains, a previous dissociation of the aggregates takes place and then, as the alkalinity increases, the helix structure is believed to denature to yield individual disordered single chains (Sletmoen & Stokke, 2008).

5. Biotechnological applications of EPS from LAB

5.1 Current applications of the EPS in the food industry

High molecular weight polysaccharides are used as additives in the manufacture of a wide variety of food products, because they act as thickeners, stabilisers, viscosifiers, emulsifiers or gelling agents. Most of these polysaccharides are derived from plants (e.g. pectin, cellulose) and seaweeds (e.g. alginate, carrageenan) (Kleerebezem et al., 1999). In terms of applications in the food industry, microbial extracellular polysaccharides including HePS such as xanthan from the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* and gellan from *Sphingomonas paucimobilis*, are also alternative sources of biothickeners approved by the FDA for use as food additives (Laws et al., 2001). Although these are prepared in reliable quantities, their physical properties might not suit all applications, given that there is also a demand for novel materials that can improve rheological characteristics and health promoting properties. On the other hand, the use of bacterial polysaccharides as food additives requires their production by non-pathogenic bacteria. In this sense, LAB have QPS (qualified presumption of safety) status and EPS produced by these bacteria can be considered as food-grade additives (Ruas-Madiedo et al., 2008).

LAB are routinely used in food preparations, not only due to their metabolic activities, but also due to their preservative effects such as: (i) acidification or production of hydrogen peroxide and (ii) the production of bacteriocins (e.g. nisin), which restrict microbial contamination (Kuipers et al., 1998; Wood, 1997). In addition, EPS production by LAB has received considerable attention, since they provide thickening properties and contribute to improve the texture and mouth-feel of the resulting fermented milks or other dairy products. Moreover, certain EPS produced by LAB, have beneficial effects on human health such as cholesterol-lowering, immunomodulation and prebiotic effect, features that are discussed later. It is therefore considered an advantage to use these polymers as food additives rather than the gram-negative polymers, for which no health promoting abilities have been proposed (Ruas-Madiedo et al., 2008).

EPS may act both as a texturizer, improving the rheology (viscosity and elasticity) of a final product, and as physical stabilizers by binding hydration water and interacting with other milk constituents (ions and proteins) thus limiting syneresis. These physical and rheological properties depend on features such as chemical composition, molecular size, charge, presence of side chains, rigidity of the molecules and 3D-structures of the EPS polymers. In addition to physical characteristics, the interactions between EPS and various components in food products contribute to the development of the final product. Nevertheless, many studies have shown that rheological properties of fermented milk products do not correlated well with the amount of EPS content (de Vuyst et al., 2001; Duboc & Mollet, 2001; Folkenberg et al., 2006).

Despite the above, EPS from LAB have not yet been exploited industrially as food additives and one of the main drawbacks to use these polymers for such purpose is the low production level compared with xanthan (de Vuyst & Degeest, 1999). Furthermore, low cost culture media and easy isolation procedures, both rendering high yields are essential for the application of EPS as food grade additives. For this reason, production *in situ* by LAB can be an alternative to the use of biopolymers from plants or non-GRAS bacteria. In particular, HePS producing LAB are used in the dairy industry, mostly belonging to the genera *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* to improve the texture and organoleptic properties of the product. Some examples of these are the production of fermented milks such as viili and langmjolk in Nordic countries as well as the production of kefir, yogurt and low fat cheese type mozzarella and Cheddar cheese (de Vuyst et al., 2001; Ricciardi & Clementi, 2000; Ruas-Madiedo et al., 2008). Another application in development for the bakery industry is the *in situ* production of glucans or fructans by the use of *Lactobacillus* or *Weissella* strains in sour dough manufacture (Tieking et al., 2003).

The use of cereal-base substrates is considered as a promising alternative to fermented dairy products due to their high nutritional value and the presence of both soluble and insoluble dietary fiber (Angelov et al., 2005; Martensson et al., 2005). In this sense, regarding the development of new functional foods, and their particular ability to produce 2-substituted (1,3)- β -glucans, *P. parvulus* 2.6 and *Lb. diolivorans* G77 have been studied as starter cultures in the preparation of oat-based fermented foods. It has been found that these bacteria can grow and produce the EPS in the oat-base substrate, improving the viscosity and texture of the fermented product (Martensson et al., 2003). In addition, analysis of the rheological properties of the β -glucan synthesized by *P. parvulus* 2.6 showed that it has potential utility as a biothickener (Velasco et al., 2009). Also, it has been reported that differences in the

viscosity of two cultures of different strains of *Pediococcus parvulus* were not attributable to differences in the primary structure or molecular mass of the β -glucan produced (Garai-Ibabe et al., 2010). Other factors such as EPS conformation or interactions between EPS and growth media microstructure could also affect the rheological features. Thus, presumably in the near future, 2-substituted (1,3)- β -glucan-producing LAB will be used for elaboration of non-dairy fermented food. Moreover, the β -glucan could be used as a food additive, due to its gelling properties.

5.2 Potential applications of EPS for production of functional food

5.2.1 Prebiotics

The concept of prebiotic was originally defined as “non-digestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon, and thus improves host health” (Gibson & Roberfroid, 1995). Nine years later, this definition was revised by Gibson et al. (2004) and redefined the concept of prebiotic as “a selectively fermented ingredient that allows specific changes, both in the composition and/or activity in the gastrointestinal microbiota that confers benefits upon host wellbeing and health”.

The non-digestible oligosaccharides (NDO) are the prototypes of prebiotic saccharides. The oligosaccharides are compounds with lower molecular weight due to a lower degree of polymerization (DP). Although the IUB-IUPAC defined oligosaccharides as saccharides composed of 3 to 10 monosaccharide units, other sources define them as compounds with 3 to 20 monosaccharide units. Since, there is not a standard definition, the use of “short-chain carbohydrates” as a term to include oligosaccharides and smaller polysaccharides seems to be more appropriate. The NDO are oligosaccharides with monosaccharide units, having a configuration that makes their osidic bonds non-digestible by the hydrolytic activity of the human digestive enzymes (Roberfroid & Slavin, 2000). They have a low calorific value, non-cariogenicity, are associated with a lower risk of infections and diarrhoea, promote the growth of beneficial bacteria in the colon and an improvement of the immune system response (Mussatto & Mancilha, 2007). The ability of the gut microbiota to ferment oligosaccharides depends on a variety of factors including the degree of polymerization, type of sugar, the glycosidic linkage and the degree of branching, as well as the synergy between bacteria during fermentation, the relationship between substrate bacteria and fermentation products, the nature of the fermentations and the saccharolytic capacity of the bacteria (Voragen, 1998).

The production of oligosaccharides in food started to be investigated in Japan, between 1970-1975, and since then a number of these biopolymers have been identified (Table 1). The USA and Europe have recently become leaders in fructan, fructo-oligosaccharide (FOS) and inulin production. The reason is linked to their low cost production as well as the reproducibility of prebiotic effects in humans. Galacto-oligosaccharides (GOS) are also commercialized in these countries but not yet as widely used as fructans. (Rastall & Maitin, 2002).

The oligosaccharides have been widely used in foods, beverages and confectionery due to their properties as hygroscopicity, stabilization of active substances (involved in e.g. flavour

and colour), water activity, sweetness and bitterness. They can be obtained by three different ways: (i) extraction with hot water from roots (e.g. inulin) or seeds (e.g. soybean oligosaccharides), (ii) enzymatic synthesis from one or a mixture of disaccharides using osyl-transferases (e.g. fructooligosaccharides) or (iii) partial enzymatic hydrolysis of oligosaccharides (e.g. oligofructose) or polysaccharides (e.g. xylooligosaccharides) (Roberfroid & Slavin, 2000).

Compound	Molecular structure*	Raw material	Process
Cyclodextrins	(Glu) _n	Starch	transglycosylation
Fructooligosaccharides	(Fru) _n -Glu	Sucrose	transglycosylation
Galactooligosaccharides	(Gal) _n -Glu	Lactose	transglycosylation
Gentiooligosaccharides	(Glu) _n	Starch	transglycosylation /hydrolysis
Glycosylsucrose	(Glu) _n -Fru	Sucrose	transglycosylation
Isomaltooligosaccharides	(Glu) _n	Starch	transglycosylation /hydrolysis
Isomaltulose (palatinose)	(Glu-Fru) _n	Sucrose	transglycosylation
Lactosucrose	Gal-Glu-Fru	Lactose/Sucrose	transglycosylation
Lactulose	Gal-Fru	Lactose	isomerization
Maltooligosaccharides	(Glu) _n	Starch	hydrolysis
Raffinose	Gal-Glu-Fru	Sucrose	extraction
Stachyose	Gal-Gal-Glu-Fru	Sucrose	extraction
Soybean oligosaccharides	(Gal) _n -Glu-Fru	Starch	extraction
Xylooligosaccharides	(Xyl) _n	Xylan	hydrolysis

Table 1. Non-digestible oligosaccharides. * Glu, glucose; Fru, fructose; Gal, galactose; Xyl, xylose

Polysaccharides are often the main source of bioactive oligosaccharides and therefore new sources of them are continuously investigated. In this context, LAB have become a promising target due to its GRAS/QPS status. Currently, bioactive commercialized oligosaccharides are extracted from plants but not yet from LAB. However, the high diversity of LAB and their EPS offer new possibilities for detection and production of bioactive oligosaccharides. To obtain oligosaccharides, the post-synthetic engineering strategies consist in enzymatic or chemical actions involving two types of enzymes, glycosyl-hydrolases (EC 3.2.1.y) and polysaccharide lyases (EC 4.2.2.y). A strategy to make the action of the enzyme specific is to grow the EPS-producing bacteria on plates with their own polysaccharide as a carbon source so that in order to survive, they themselves secrete

EPS degrading enzymes. After detection and purification, a specific enzyme for catalysis of the polysaccharide is obtained (Badel et al., 2011).

5.2.2 Immunomodulators

An immunomodulator is a substance which has an effect on the immune system. This system can be regulated in different ways by the use of immunosuppressors or immunostimulants to inhibit or to induce the immune response. In particular, their use, included as additives in food, could be useful to combat infections, to prevent digestive tract cancers or to treat sicknesses due to immunodeficiency, such as inflammatory bowel diseases (Crohn's disease and ulcerative colitis). One strategy to modulate the immune system is the modulation of cytokine expression through the use of herbal medicines. The immunomodulators alter the activity of immune function through the dynamic regulation of informational molecules such as cytokines (Spelman et al., 2006).

The mechanism involved in the immunomodulation can be explained by the interaction of the immunomodulators to their receptor in the membrane of an immune system cell. This interaction activates an internal cascade of phosphotranfer of proteins mediated by kinases and related to a specific pathway. As a consequence, a change of binding affinity of transcriptional regulators for their operators takes place, which results in activation or repression of gene expression (Figure 6).

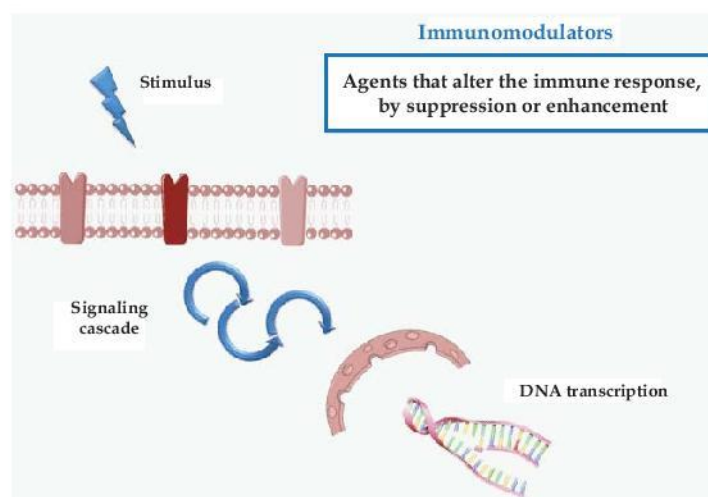


Fig. 6. Stimulation and/or inhibition mediated by immunomodulators

Neither HoPS nor HePS produced by LAB have been used to elaborate functional food, nor directly tested as immunomodulators. However, most of the LAB used as probiotics (according to FAO/WHO, "live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host") for elaboration of functional food, have immunomodulatory properties (Foligne et al., 2007), and produce EPS. However, their ability to immunomodulate is strain specific and can not yet be directly connected to the EPS. In addition, current knowledge (see below) indicates that the nature and structure of

some of these biopolymers synthesized by LAB have the potential to be used as immunomodulating food additives.

β -glucans are known as "biological response modifiers" (Wasser, 2011), due to their ability to activate the immune system. β -glucans are integral cell wall components of a variety of fungi, plants and bacteria. In the early 40's Pillemer and Ecker (1941) described the effect of a crude yeast cell wall, called Zymosan, and described that this extract was able to activate the non-specific innate immunity. Only in the 80's Czop and Austen (1985) described the action of Zymosan that involved its binding to a β -1-3-glucan specific receptor, latter on identified and named Dectin-1 (Brown et al., 2001), found in the cell membrane of macrophages, which activates an internal cascade of events.

The immunomodulating function of the β -glucans is related to their structure; in fact different polysaccharides are able to interact with specific receptors, due to their 3D-structure. It has been recently demonstrated that β -glucans with a linear backbone containing 1-3 linkage (e. g. Zymosan) have the ability to activate several receptors: Dectin-1, complement receptor 3 (CR3), scavenger receptors class A and class B, and Toll-like receptors (TLRs) 2 and 6 (Chlubnova et al., 2011). The interaction with these receptors triggers a cascade of internal effects, including production of cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10).

Also branched 6-substituted (1,3)- β -glucans isolated from mushroom, *Candida albicans* and *Pneumocystis carinii*, show high affinity for Dectin-1 (Palma et al., 2006) and for TLR-2 and TLR-4 receptors in elicitation of immune response (Chlubnova et al., 2011). Mushroom, especially Basidiomycetes, are a source of β -glucans with a high biological activity. They mostly have a 1-3 linkage in the main chain, and sometimes an additional 1-6 branch point. This branching point increase their antitumoral and immunomodulating effects (Barreto-Bergter & Gorin, 1983). It is well established that the structural composition offers a higher capacity for carrying biological information, because they have a greater potential for structural variability, specially related to the triple-helical tertiary conformation (Yanaki et al., 1983). A good example of a preventive effect is given by a Japanese study on their popular edible and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Ikekawa, 2001). In this study mice were divided into two groups: untreated and treated with a diet containing 5% of the dried fruiting body of *H. marmoreus*. All mice were injected with a strong carcinogen, methyl-cholanthrene, and carcinogenesis was investigated. The results obtained allowed to the authors to conclude that the mechanism of prevention and inhibition of carcinogenesis was due to immunopotentialization (Ikekawa, 2001). Therefore, (1,3) β -glucan produced by LAB and their producing strains have potential as immunomodulators.

In this line, it has been shown that 2-substituted (1,3) β -glucan producer LAB belonging to the *Lactobacillus* and *Pediococcus* genera are able to immunomodulate macrophages *in vitro* (Fernández de Palencia et al., 2009; Garai-Ibabe et al., 2010). Moreover, treatment of the macrophages with the purified biopolymer resulted in an increase of secretion of the anti-inflammatory IL-10 cytokine (Fernández de Palencia et al., unpublished results). In addition, four β -glucan-producing LAB strains have been tested for their survival under gastrointestinal stress (Fernández de Palencia et al., 2009; Garai-Ibabe et al., 2010) using an *in vitro* model that simulates the human gut conditions (Fernández de Palencia et al., 2008). Among them, *P. parvulus* 2.6 and *Lb. suebicus* CUPV221 showed significant

resistance to digestive tract gut conditions. Furthermore, the presence of the EPS conferred to the producing strains increased capability to adhere to Caco-2 human epithelial intestinal cells (Garai-Ibabe et al., 2010; Fernández de Palencia et al., 2009). Thus, the use of the 2-substituted (1,3) β -glucan as an additive, or produced *in situ*, in fermented food or in the gut has potential as an immunomodulator to alleviate inflammatory bowel diseases. In addition, human consumption of oat-based food prepared with *P. parvulus* 2.6 resulted in a decrease of serum cholesterol levels, boosting the effect previously demonstrated for (1,3)- β -D-glucans in oat (Martensson et al., 2005). Finally, the production of yogurt and various beverages with 2-substituted β -D-glucan-producer LAB indicate advantageous techno-functional properties of these strains (Elizaquível et al., 2011). Therefore, LAB producing this EPS have potential as probiotic strains useful for the manufacture of functional foods.

Dextrans have been also investigated as immunomodulators. Previous studies on dextran-70 justified its beneficial effect in the prevention of acute respiratory distress syndrome after trauma and sepsis as well as pancreatitis (Modig, 1988). Recently, it was reported that dextran-70 reduced the leukocyte-endothelium interaction. In a clinical trial forty patients who were undergoing coronary bypass surgery were divided into 2 groups of 20. In group A a dextran-70 infusion was administrated at a concentration of 7.5 ml kg⁻¹ before the surgery, and 12.5 ml kg⁻¹ after the cardiopulmonary bypass. Group B was the control and received a gelatin infusion at the same concentration. Several parameters were measured including determination of IL 8, IL 10 and troponin-I levels. The conclusion was that this α -glucan was able to reduce the systemic inflammatory response and the release of the cardiac troponin-I after cardiac operation (Gombocz et al., 2007).

Another α -glucan from the edible mushroom *Tricholoma matsutake* has been investigated, and reported to have excellent biological activities; exerting modulating effects on the immune competence of mice and rats. In this study, a sodium hydroxide extract of the mushroom was defatted followed by fractionation with a combination of ion exchange chromatography and gel filtration to identify the active component. A single-peak fraction (MPG-1) was obtained after reverse-phase chromatography. MPG-1 was a glycoprotein with molecular mass of 360 kDa, and contained about 90% glucose. NMR and methylation analysis revealed that the α -1,4-linkage was the predominant glucan linkage with α -1,6- and α -1,2-branching in the minority. It was demonstrated that the mycelium preparation is effective in improving immunological functions in stressed individuals. In an *in vitro* model the compound formed a complex with the active form of TGF- β 1. These results indicate that the mycelium contains a novel α -glucan-protein complex with immunomodulatory effect (Hoshi et al., 2005).

Therefore, the high production of α -glucans by LAB and the immunomodulatory properties of these bio-molecules as described above, predict that in the near future studies will be performed to evaluate the beneficial properties of these EPS, with the aim to use them as food additives.

Finally, the low yield of HePS produced by LAB and their complex biosynthetic pathway, suggests that in the short term they are not very good candidates as food additives, although it is expected that the immunomodulatory properties of the producing strains will be further investigated.

6. Conclusion

Currently it is clear that diversification of functional foods, which have been scientifically validated as having beneficial properties, will increase in the near future, and the EPS synthesized by LAB could have a place in the market as an ingredient of this type of food. To this end, EPS can be synthesized *in situ* by their producing strains or can be used in isolated form as a food additive. Their chances of reaching the Market place will be improved by the discovery and utilization of new EPS-producing strains isolated from sources other than dairy products. The discovery and characterization of new EPS-producers isolated from food (e.g. processed meat products) and beverages (e.g. wine and cider) will increase the variety of EPS and the use of their producing strains for the elaboration of novel solid and liquid functional food. For example, *Lc. mesenteroides* *Lb. plantarum* and *Lb. sakei* strains have been isolated from Spanish sausages. They produce highly homogeneous, α -glucan HoPS synthesised by a dextransucrase, and are able to immunomodulate macrophages (Nácher-Vázquez et al., unpublished results). Microorganisms that are native to the human gut and produce EPS (or could be engineered to produce EPS) would also be of great interest as their chances of survival in the gut environment would be much higher than other microbes. It has been shown that microorganisms that produce 2-substituted-(1,3)- β -glucan are able to adhere to human gut epithelial cells. Such organisms would presumably be able to colonise the gut and compete effectively with pathogens, at the same time as producing a beneficial immunomodulation.

However, the use of EPS producing LAB strains will require a thorough scientific evaluation both *in vitro* and *in vivo*. It has to be stated that currently most of the general claims for components of functional food (though this does not apply to oat β -glucans and their blood LDL-cholesterol lowering properties) have not been approved for use after evaluation by the European Food Safety Authority (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu>). The main reason for rejection of probiotic bacteria has been the lack of enough characterization of the bacteria (determination of the nucleotide sequence of their entire genome is advisable), and/or insufficient scientific evidence to correlate the use of the bacteria with health benefits (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* AY/CSL and *S. thermophilus* 9Y/CSL and beneficial modulation of the gut microbiota). Therefore, each particular strain has to be subjected to evaluation, although its EPS has been already experimentally validated. The evaluation should be performed, first *in vitro*, then in animal models and finally in human trials. In addition, due to the rules of the EFSA the use of genetically modified organisms (GMO) is restricted (although they are not totally forbidden). Moreover, the opinion of consumers in Europe and USA regarding the use of GMO in food is not favourable. Consequently, well-characterized (preferably GRAS) EPS-producers from natural ecological environments are the best candidates for use in functional food.

However, if the EPS are going to be used as food additives, after purification, then there is no restriction concerning the use of a GMO producing strain. The use of GMO able to produce high levels of EPS or newly designed biopolymers is still very limited, and the production levels of most EPS are not very high. Therefore, provided that enzymes, and hence the genes, involved in their biosynthetic pathways are known, the future improvement of EPS production, will be by DNA recombinant technology and metabolic engineering to generate GMO EPS-producing LAB, that will be used for production of the biopolymers in large-scale fermenters. Moreover, genetic engineering could be used to alter

substrate specificity of the EPS biosynthetic enzymes to generate new polysaccharides and oligosaccharides with improved prebiotic properties. In the case of the glycosyltransferases, which synthesize HoPS this strategy could result in the synthesis of not only new HoPS, but also new HePS. Finally, the requirement of only one protein for the synthesis opens the window for production of new biopolymers by immobilized enzymes.

Overall, there should be a rapid expansion in the development of novel LAB probiotic organisms and their prebiotic EPS products. However, their ultimate success in the market place will require a rigorous scientific evaluation.

7. Acknowledgments

We thank Dr Stephen Elson for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant AGL2009-12998-C03-01). Sara Notararigo and Montserrat Nàcher are recipients of predoctoral fellowships from Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

8. References

- Adeyeye, A., Jansson, P.E., & Lindberg, B. (1988). Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 37. *Carbohydrate Research*, Vol.180, No.2, (September 1988), pp. 295-299
- Angelov, A., Gotcheva, V., Hristozova, T., & Gargova, S. (2005). Application of pure mixed probiotic lactic acid bacteria and yeast cultures for oat fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.85, No.12, (September 2005), pp. 2134-2141
- Aslan, Y., & Tanriseven, A. (2007). Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. *Biochemical Engineering Journal*, Vol.34, No.1, (April 2007), pp. 8-12
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, Vol.29, No.1, (January-February 2011), pp. 54-66
- Barreto-Bergter, E., & Gorin, P.A. J., (1983). Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, R.S. Tipson and H. Derek, pp.67-103, Academic Press, ISBN: 0065-2318
- Boels, I.C., Kleerebezem, M., & de Vos, W.M. (2002). Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, Vol.69, No.2 (February 2002), pp. 1129-1135
- Bourgoin, F., Pluvinet, A., Gintz, B., Decaris, B., & Guédon, G. (1999). Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci?. *Gene*, Vol.233, No.1-2, (June 1999), pp. 151-161
- Breton, C., Snajdrová, L., Jeanneau, C., Koca, J., & Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, Vol.16, No.2, (February 2006), pp. 29R-37R
- Brock, T.D. (2008). Biology of Microorganisms. 12th ed. M. Madigan, J. Martinko, J. Parker. Pearson/Prentice-Hall ISBN 0321536150
- Brown, G.D., & Gordon, S. (2001). A new receptor for β -glucans. *Nature*, Vol.413, (September 2001), pp. 36-37

- Capek, P., Hlavonová, E. Matulová, M., Mislovicová, D. Ruzicka, J., Koutný, M., & Keprdová, L. (2011). Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by *Leuconostoc garlicum* PR. *Carbohydrate Polymers*, Vol.83, No.1, (January 2011), pp. 88-93
- Charnock, S.J., Henrissat B., & Davies, G.J. (2001). Three-dimensional structures of UDP-sugar glycosyltransferases illuminate the biosynthesis of plant polysaccharides. *Plant Physiology*, Vol.125, No.2, (February 2003), pp. 527-531
- Chlubnová, I., Sylla, B., Nugier-Chauvin, C., Daniellou, R., Legentil, L., Kralova, B., & Ferrières, V. (2011). Natural glycans and glycoconjugates as immunomodulating agents. *Natural Product Reports*, Vol.28, No. 5, (March 2011), pp. 937-952
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 284, (1984), pp.179-185
- Coutinho, P.M., Deleury E., Davies G.J., & Henrissat B. (2003). An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, Vol.328, No.2, (April 2003), pp. 307-317
- Czop, J., & Austen K. (1985). A β -glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *The Journal of Immunology*, Vol.134, No.4, (April 1985), pp. 2588-2593
- Dabour, N., & LaPointe, G. (2005). Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.71, No.11, (November 2005), pp. 7414-7425
- de Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol.23, No.2, (April 1999), pp. 153-17
- de Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelmem, F., & Degeest B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, Vol.11, No.9, (October 2001), pp. 687-707
- Dols-Lafargue, M., Lee, H.Y., Le Marrec, C., Heyraud, A., Chambat, G., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genome of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.74, No.13, (July 2008), pp. 4079-4090
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, Vol.28, No.3, (March 1956), pp. 350-356
- Duus, J.O., Gotfredsen, C.H., & Bock, H. (2000). Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. *Chemical Reviews*, Vol.100, No.12, (November 2000), pp. 4589-4614
- Dueñas, M., Munduate, A., Perea, A., & Irastorza, A. (2003). Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.87, No.1-2, (October 2003), pp. 113-120
- Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Mateo, P.T., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J., Irastorza-Iribas, A., & Gil-Serrano, A.M. (1997). Structural analysis of

- the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*, Vol.303, No.4, (October 1997), pp. 453-458
- Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., & Gil-Serrano, A.M., (1998). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydrate Research*, Vol.307, No.1-2, (February 1998), pp. 125-133
- Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, Vol.11, No.9, (October 2001), pp. 759-768
- Elizaquível, P., Sánchez, G., Salvador, A., Fiszman, S., Dueñas, M.T., López, P., Fernández de Palencia, P., & Aznar, R. (2011). Evaluation of yogurt and various beverages as carriers of lactic acid bacteria producing 2-branched (1,3)- β -D-glucan. *Journal of Dairy Science*, Vol.94, No. 7 (July 2011), No. pp. 3271-3278
- Erhardt, F.A., Kügler, J., Chakravarthula, R.R., & Jördening, H.J. (2008). Co-Immobilization of dextranase and dextranase for the facilitated synthesis of isomaltoligosaccharides: preparation, characterization and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.100, No.4, (July 2008), pp. 673-683
- Fernández de Palencia, P., López, P., Corbí, A., Peláez, C., & Requena, T. (2008). Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology*, Vol. 227, No.5, (March 2008), pp. 1475-1484
- Fernández de Palencia, P., Werning, M.L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Corbí, A., & López, P. (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.75, No.14, (July 2009), pp. 4887-4891
- Foligne, B., Nutton, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poirer, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., & Pot, B. (2007). Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, Vol.14, No.2, (January 2007), pp. 236-243
- Folkenberg, D.M., Dejmek, P., Skriver, A., Guldager, H.S., & Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures *International Dairy Journal*, Vol.16, No.2, (February 2006), pp. 111-118
- Garai-Ibabe, G., Areizaga, J., Aznar, R., Elizaquível, P., Prieto, A., Irastorza, A., & Dueñas, M.T. (2010). Screening and selection of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, Vol. 58, No. 10, (December 2010), pp. 6149-6156
- Garai-Ibabe, G., Werning, M.L., López, P., Corbí, A.L., & Fernández de Palencia, P. (2010). Naturally occurring 2-substituted (1,3)- β -D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the food industry. *Bioresource Technology*, Vol.101, No.23, (December 2010), pp. 9254-9263
- García, E., Llull, D., Muñoz, R., Mollerach M., & López R. (2000) Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Research in Microbiology*, Vol.151, No.6, (July 2000), pp. 429-435
- Garinot-Schneider, C., Lellouch, A.C., & Geremia, R.A. (2000) Identification of essential amino acid residues in the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase ExoM. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.183, No.1, (October 2000), pp. 31407-31413

- Gänzle, M., & Schwab, C. (2009). Ecology of exopolysaccharide formation by lactic acid bacteria: sucrose utilisation, stress tolerance, and biofilm formation, In: *Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends*, Matthias Ullrich, pp. (263-278) Caister Academic Press, ISBN 978-1-904455-45-5, Norfolk, UK.
- Gibson, G.R., & Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, Vol.125, No.6, (June 1995), pp. 1401-1412
- Gibson, GR., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., & Roberfroid, M. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, Vol.17, No.2, (December 2004), pp. 259-275
- Glucksmann, M.A., Reuber, T.L., & Walker, G.C. (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, Vol.175, No.21, (November 1993), pp. 7045-7055
- Gombocz, K., Beledi, A., Alotti, N., Kecskes, G., Gabor, V., Bogar, L., Koszegi, T., & Garai, J. (2007). Influence of dextran-70 on systemic inflammatory response and myocardial ischaemia-reperfusion following cardiac operations. *Critical Care*, Vol.11, No.4, (August 2007), pp. R87
- Goulas, A. K., Cooper, J.M., Grandison, A.S., & Rastall, R.A. (2004). Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.88, No.6, (December 2004), pp. 778-787
- Helderman, C.; DeAngelis, P.L., & Weigel, P.H. (2001). Topological organization of the hyaluronan synthase from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.276, No.3, (January 2001), pp. 2037-2046
- Henrissat, B., & Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemistry Journal*, Vol. 316, No.2, (June 1996), pp. 695-696
- Hoshi, H., Yagi, Y., Iijima, H., Matsunaga, K., Ishihara, Y., & Yasuhara, T. (2005). Isolation and characterization of a novel immunomodulatory alpha-glucan-protein complex from the mycelium of *Tricholoma matsutake* in basidiomycetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.53, No.23, (November 2005), pp. 8948-8956
- Ibarburu, I., Soria-Diaz, M.E., Rodriguez-Carvajal, M.A., Velasco, S.E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A. M., Irastorza, A., & Dueñas, M.T. (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.103, No.2, (August 2007), pp. 477-486
- Ikeda, S., & Shisido, Y. (2005). Atomic force studies on heat-induced gelation of curdlan. *Journal of Agricultural Chemistry*, Vol.53, No.3 (January 2005), pp. 786-791
- Ikekawa, T. (2001). Beneficial Effects of Edible and Medicinal Mushrooms. *Health Care*, Vol.3, No.4, (December 2001), pp. 8
- Jolly, L., & Stingle, F. (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in Lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, Vol.11, No.9, (October 2001), pp. 733-745
- Karnezis, T., Epa, V.C., Stone, B.A., & Stanisich, V.A. (2003). Topological characterization of an inner membrane (1->3)- β -D-glucan (curdlan) synthase from *Agrobacterium* sp. strain ATCC31749. *Glycobiology*, Vol.13, No.10, (October 2003), pp. 693-706

- Keenleyside, W.J., Clarke, A.J., & Whitfield, C. (2001). Identification of Residues Involved in Catalytic Activity of the Inverting Glycosyl Transferase WbbE from *Salmonella enterica* serovar borreze. *Journal of Bacteriology*, Vol.183, No.1, (January 2001), pp. 77-85
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F., & Ziegler, G.R. (1998). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.64, No.2, (February 1998), pp. 659-664
- Kleerebezem, M., van Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I.C., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J., & de Vos, W.M. (1999). Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol.76, No.1-4, (July-November 1999), pp. 357-365
- Korakli, M., & Vogel, R.F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.71, No.6, (April 1986), pp. 790-803
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M., & de Vos, W.M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, Vol.64, No.1, (September 1998), pp. 15-21
- Laine, R.A., Esselman, W.J., & Sweeley, C.C. (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. In: *Methods in Enzymology*. V. Ginsburg, pp. 159-167, Academic Press, ISBN: 0076-6879
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., & Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, Vol.77, (July 2008), pp. 521-555
- Lamothe, G.T., Jolly, L., Mollet, B., & Stingle, F. (2002). Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *Archives of Microbiology*, Vol. 178, No.3, (September 2002), pp. 218-228.
- Laws, A, Gu, Y., & Marshall, V. (2001) Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, Vol.19, No.8, (December 2001), pp. 597-62
- Leal, D., B. Matsuihiro, B., Rossi, M., & Caruso, F. (2008). FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*, Vol.343, No.2, (February 2008), pp. 308-316
- Lin, W.S.; Cunneen, T., & Lee, C.Y. (1994). Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type 1 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, Vol.176, No.22, (November 1994), pp. 7005-7016
- Liu, J.R., Wang, S.Y., Lin, Y.Y., & Lin, C.W. (2002). Antitumor activity of milk-kefir and soymilk-kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, Vol.44, No.2, (November 2009), pp. 182-187
- Llaubères, R. M., Richard B., Lonvaud, A., Dubourdieu, D., & Fournet, B. (1990). Structure of an exocellular β -D-glucan from *Pediococcus* sp, a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research*, Vol.203, No.1, (August 1990), pp. 103-107
- Llull, D., Garcia, E., & Lopez, R. (2001). Tts, a processive β -glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in pneumococcus and other gram-positive species. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.276, No.24, (June 2001), pp. 21053-21061

- Palma, A.S., Feizi, T., Zhang, Y., Stoll, M.S., Lawson, A.M., Díaz-Rodríguez, E., Campanero-Rhodes, M.A., Costa, J., Gordon, S., Brown, G.D., & Chai, W. (2006). Ligands for the β -glucan receptor, Dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.281, No.9, (March 2006), pp. 5771-5779
- Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P., & Roy, D. (2005). Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology*, Vol.151, No.6, (June 2005), pp. 1839-1851
- Pillemer, L., & Ecker, E.E. (1941). Anticomplementary factor in fresh yeast. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.137, No.1, (January 1941), pp. 139-142
- Rastall, R.A., & Maitin, V. (2002). Prebiotics and synbiotics: towards the next the generation. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol.13, No.5, (October 2002), pp. 490-496
- Ricciardi, A., & Clement, F. (2000). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications. In: *Italian Journal of Food Science*, Vol.12, No.1, (June 2000), pp. 23-45, ISSN 1120-1770
- Roberfroid, M., & Slavin, J. (2000). Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.40, No.6, (November 2000), pp. 461-480
- Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilan, C.G. (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, Vol.88, No.3 (March 2005), pp. 843-856
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F., & de los Reyes-Gavilán, C.G. (2008). Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications*. B. Mayo, P. López, and G. Pérez-Martín (Ed.), 137-166, Research Signpost, ISSN 978-81-308-0250-3, Kerala, India
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Arigoni, F., de los Reyes-Gavilan, C.G., & Margolles, A. (2009) Bile Affects the Synthesis of Exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.75, No.4, (February 2009), pp. 1204-1207
- Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., & de los Reyes-Gavilan, C.G. (2009) Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: *Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends*, Matthias Ullrich (Ed.), pp. (279-310), Caister Academic Press, ISBN 978-1-904455-45-5, Norfolk, UK
- Sarwat, F., Ul Qader, S.A., Aman, A., & Ahmed, N. (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* cmg713. *International Journal of Biological Sciences*, Vol.4, No.6, (July 2008), pp. 379-386.
- Silver, R.P., Prior, K., Nsahlai, C., & Wright, L.F. (2001). ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Research in Microbiology*, Vol.152, No.3-4, (April-May 2001), pp. 357-364
- Sinnott, M.L. (1991). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews*, Vol.90, No.7, (November 1990), pp. 1170-1202
- Spelman, K., Burns, J., Nichols, D., Winters, N., Ottersberg, S., & Tenborg, M. (2006). Modulation of cytokine expression by traditional medicines: A review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review*, Vol.11, No.2, (June 2006) pp. 128-150

- Sletmoen, M., & Stokke, B. T. (2008). Higher order structure of (1,3)- β -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers*, Vol.89, No.4, (January 2008), pp. 310-321
- Stack, H.M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., & Ross, R.P. (2010). Association of β -glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.76, No.2, (January 2010), pp. 500-507
- Stingele, F., Newell, J.W., & Neeser, J.R. (1999). Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, Vol.181, No.20, (October 1999), pp. 6354-6360
- Tanriseven, A., & Dogan S., (2002). Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres. *Process Biochemistry*, Vol. 37, No.10, (October 2001), pp. 1111-1115
- Tarbouriech, N., Charnock, S.J., & Davies, G.J. (2001). Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, Vol.314, No.4, (December 2001), pp. 655-661
- Tieking, M., Koraki, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., & Vogel, R.F. (2003). In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.69, No.2, (February 2003), pp. 945-952
- Tieking, M., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., & Gänzle, M.G. (2005). Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.66, No.6, (March 2005), pp. 655-663
- Tlapak-Simmons, V. L., Baggenstoss, B. A., Clyne, T., & Weigel, P. H. (1999). Purification and lipid dependence of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.274, No.7, (February 1999), pp. 4239-4245
- Tlapak-Simmons, V.L., Kempner, E.S., Baggenstoss, B.A., & Weigel, P.H. (1998). The active streptococcal hyaluronan synthases (HASs) Contain a Single HAS Monomer and multiple cardiolipin molecules. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.273, No.40, (October 1998), pp. 26100-26109
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., & De Vuyst, L. (2007). Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.118, No.3, (July 2007), pp. 250-258
- van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., & van Geel-Schutten, I.G.H. (2006). Structure-function Relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol.70, No.1, (March 2006), pp. 157-176
- van Hijum, S.A.F.T., Szalowska, E., van der Maarel, M.J.E.C., & Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, Vol.150, No.3, (March 2004), pp. 621-630
- Velasco, S. E., Areizaga, J., Irastorza, A., Dueñas, M.T., Santamaria, A., & Muñoz, M.E. (2009). Chemical and rheological properties of the β -glucan produced by

- Pediococcus parvulus* 2.6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.57, No.5, (March 2009), pp. 1827-1834
- Vijayendra, S.V., & Babu R.S. (2008). "Optimization of a new heteropolysaccharide production by a native isolate of *Leuconostoc* sp. Cfr-2181. *Letters in Applied Microbiology*, Vol.46, No.6, (Jun 2008) pp. 643-648
- Voragen, A.G.J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science and Technology*, Vol.9, No. 8-9, (August 1998) pp. 328-335
- Wasser, S.P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.89, No.5, (March 2011) pp. 1323-1332
- Walling, E., Gindreau, M., & Lonvaud-Funel, A. (2001). La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus dammosus* isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. *Lait*, Vol.81, No.1-2, (January-April 2001), pp. 289-300
- Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J., & López, P. (2006). *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for Specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*, Vol.69, No.1, (January 2006), pp. 161-169
- Werning, M.L., Corrales, M.A., Prieto, A., Fernández de Palencia, P., Navas, J., & López, P. (2008). Heterologous expression of a position 2-substituted (1 \rightarrow 3)- β -glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, Vol.74, No.16, (August 2008) pp. 5259-5262
- Wood, B.J.B. (1997). *Microbiology of fermented food*, Blackie Academic & Professional, ISBN 0-7514-0216-8, London, United Kingdom
- Wu, J., Zhang, Y., Wang, L., Xie, B., Wang, H., & Deng, S. (2006). Visualization of single and aggregated hullless oat (*Avena nuda* L.) (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan molecules by atomic force microscopy and confocal scanning laser microscopy. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, Vol.54, No.3, (January 2005), pp. 925-934
- Yanaki, T., Ito, W., Tabata, K., Kojima, T., Norisuye, T., Takano, N., & Fujita, H. (1983). Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophysical Chemistry*, Vol.17, No.4, (June 1983), pp. 337-342



Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria

Sara Notararigo^{a,1}, Montserrat Nàcher-Vázquez^{b,1}, Idoia Ibarburu^{c,1}, M^a Laura Werning^a, Pilar Fernández de Palencia^a, M^a Teresa Dueñas^c, Rosa Aznar^{b,d}, Paloma López^{a,*}, Alicia Prieto^e

^a Department of Molecular Microbiology and Infection Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^b Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), CSIC, Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Spain

^c Department of Applied Chemistry, University of Basque Country (UPV/EHU), Paseo Manuel de Lardizábal 3, 20018 Donostia, Spain

^d Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Av. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

^e Departament of Environmental Biology, CIB, CSIC, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2011

Received in revised form 26 March 2012

Accepted 4 May 2012

Available online 11 May 2012

Keywords:

Lactic acid bacteria
Homopolysaccharides
Heteropolysaccharides
Production
Purification
Methods

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) produce homopolysaccharides (HoPS) and heteropolysaccharides (HePS) with potential functional properties. In this work, we have performed a comparative analysis of production and purification trials of these biopolymers from bacterial culture supernatants. LAB strains belonging to four different genera, both natural as well as recombinant, were used as model systems for the production of HoPS and HePS. Two well characterized strains carrying the *gft* gene were used for β -glucan production, *Pediococcus parvulus* 2.6 (*P. parvulus* 2.6) isolated from cider, and the recombinant strain *Lactococcus lactis* NZ9000[pGTF] (*L. lactis* NZ9000[pGTF]). In addition, another cider isolate, *Lactobacillus suebicus* CUPV225 (*L. suebicus* CUPV225), and *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 (*L. mesenteroides* RTF10), isolated from meat products were included in the study. Chemical analysis of the EPS revealed that *L. mesenteroides* produces a dextran, *L. suebicus* a complex heteropolysaccharide, and the β -glucan producing-strains the expected 2-substituted (1,3)- β -glucan.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Many LAB synthesize extracellular polysaccharides (exopolysaccharides, EPS), which remain attached to the outer cell wall forming a capsule or are released into the environment in the form of slimy, or ropy, EPS. These bacteria produce a wide variety of EPS with different composition, structure, molecular mass, and conformation. Most LAB synthesize HePS usually composed of D-galactose, D-glucose, and L-rhamnose. These polysaccharides are produced from sugar nucleotides by the activity of intracellular glycosyltransferases (Welman & Maddox, 2003). Other LAB produce HoPS containing only D-glucose (e.g.: dextran, reuteran, and mutan) or D-fructose (e.g.: levan and inulin) (Monsan et al., 2001). HoPS are usually synthesized by extracellular glycosucrases

(glucan- or fructan-sucrases) using sucrose as the glycosyl donor. EPS formation by glycosucrases has been reported for strains of *Lactobacillus* (Kralj et al., 2004; Tieking, Korakli, Ehrmann, Ganzle, & Vogel, 2003), *Leuconostoc* (Bounaix et al., 2010; Fraga Vidal et al., 2011; Seymour & Knapp, 1980), and *Weissella* (Galle, Schwab, Arendt, & Gaenzle, 2010) species. LAB strains belonging to the *Pediococcus*, *Lactobacillus*, and *Oenococcus* genera, isolated from cider and wine, produce a 2-substituted (1,3)- β -D-glucan (Dols-Lafargue et al., 2008; Dueñas-Chasco et al., 1997, 1998; Ibarburu et al., 2007; Llaubères, Richard, Lonvaud, Dubourdiou, & Fournet, 1990). This β -glucan is synthesized in *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus suebicus*, and *Oenococcus oeni* by a single GTF glycosyltransferase, which is a membrane-bound protein that polymerizes glucosyl residues from UDP-glucose (Garai-Ibabe et al., 2010; Velasco et al., 2007; Werning et al., 2006, 2008).

The HePS from LAB play an important role in the rheology, texture and 'mouthfeel' of fermented milks (yoghurt, viili, llangfil, etc.) (Welman & Maddox, 2003) and other fermented products, such as sorghum sourdoughs (Galle, Schwab, Arendt, & Gänzle, 2011). HoPS producers have been evaluated to a lesser extent and are used mainly for fermentation of non-dairy products. Dextrans from *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella* spp. as well as levan from *Lactobacillus sanfranciscensis* positively affect dough rheology and

* Corresponding author at: Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 837 31 12.

E-mail addresses: sikelia@cib.csic.es (S. Notararigo), montsensv@iata.csic.es (M. Nàcher-Vázquez), idoia.ibarburu@ehu.es (I. Ibarburu), mlwerning75@hotmail.com (M.L. Werning), pfpalencia@cib.csic.es (P.F. de Palencia), mariateresa.duenas@ehu.es (M.T. Dueñas), rosa.aznar@uv.es (R. Aznar), plg@cib.csic.es (P. López), aliprieto@cib.csic.es (A. Prieto).

¹ These authors contributed equally to this work.

bread texture (Di Cagno et al., 2006; Waldherr & Vogel, 2009). The analysis of the rheological properties of 2-substituted β -D-glucan showed that it has potential utility as a biothickener (Lambo-Fodje et al., 2007; Velasco et al., 2009). Testing of this β -glucan producing LAB for the production of a fermented oat product (Martensson, Oste, & Holst, 2002), yogurt, and various beverages (Elizaquível et al., 2011; Kearney et al., 2011) indicated advantageous technological properties of these strains.

Additionally, prebiotic effects of several EPS have also been demonstrated (Hongpattarakere, Cherntong, Wichienchot, Kolida, & Rastall, 2011; Korakli, Ganzle, & Vogel, 2002).

Furthermore, health benefits have been claimed for EPS from LAB because of their putative antitumoral, immunostimulatory, and blood cholesterol lowering activities (Liu et al., 2011; Welman & Maddox, 2003). In addition, β -glucan-producing *Pediococcus* (Fernández de Palencia et al., 2009) and *Lactobacillus* (Garai-Ibabe et al., 2010) are able to immunomodulate macrophages, and human consumption of oat-based food prepared with it resulted in a decrease of serum cholesterol levels, boosting the effect previously demonstrated for (1,3)- β -D-glucans in oats (Martensson et al., 2005).

Therefore, EPS from LAB are of great interest for Agro-Food industries since they have a vast structural diversity, which opens the way to innovations. Moreover, several LAB species have a "Generally Recognized As Safe" status by the American Food and Drug Association or a "Qualified Presumption of Safety" status by the European Food Safety Authority (Gueimonde, Frias, & Ouwehand, 2006). This fact facilitates the application of their polysaccharides either as additives or as *in situ*-produced thickeners. On the other hand, the low production of polysaccharides by the majority of LAB species has hampered both their molecular characterization and their commercial exploitation.

Thus, optimized methodologies of EPS production and recovery are required in order to facilitate their characterization, and thereby explore the structural diversity of LAB EPS and potential applications. The aim of the present study is, therefore, to identify optimized procedures for the synthesis and analysis of structurally different EPS produced by a variety of LAB species isolated from meat fermented products and beverages as well as by recombinant strains.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Strains used in this study were from the authors' culture collections and had been previously characterized and identified into species. *L. mesenteroides* RTF10 was isolated from meat products (Chenoll, Macián, Elizaquível, & Aznar, 2007) at the Department of Food Biotechnology, Institute of Agrochemistry and Food Technology (C.S.I.C., Valencia, Spain). *P. parvulus* 2.6 (Dueñas-Chasco et al., 1997) and *L. suebicus* CUPV225 were isolated from ropy cider at the Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry (University of the Basque Country UPV/EHU, San Sebastián, Spain). *P. parvulus* 2.6 carries the gene *gtf* that encodes the GTF glycosyltransferase, which catalyzes the synthesis of the 2-substituted- β -D-glucan. The recombinant strain *L. lactis* NZ9000[pNGTF] carries the plasmid pNGTF containing the *gtf* gene under the control of the P_{NisA} promoter, inducible by the addition of nisin to the growth medium (Werning et al., 2008). Strains were kept in Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (Pronadisa, Madrid, Spain), except *L. lactis* NZ9000 [pNGTF], which was maintained in ESTY medium (Pronadisa, Madrid, Spain), supplemented with 20% (v/v) glycerol for long-term storage at -80°C .

2.2. Production of EPS by natural LAB strains

To obtain inocula for EPS production, *L. mesenteroides* RTF10 was grown in MRS supplemented with 2% sucrose to an $\text{OD}_{600} = 1.0$ and *P. parvulus* 2.6, as well as *L. suebicus* strains, in MRS supplemented with 2% glucose, 0.05% (w/v) L-cysteine hydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany), and 0.1% (w/v) Tween 80 (Pronadisa, Barcelona, Spain) to an $\text{OD}_{600} = 2.0$. For EPS production, the inocula were diluted 1:100 in fresh media. Cultures were grown in the following media: defined CDM (Sánchez et al., 2008) for *L. mesenteroides*, semi-defined MST (Velasco et al., 2006) for *P. parvulus* and SMD containing glucose (20 g L^{-1}) (Dueñas-Chasco et al., 1997) for *L. suebicus*. Batch fermentations without pH control were carried out for the two lactobacillus strains. For *P. parvulus* fermentation were performed in media containing glucose (50 g L^{-1}) and ethanol 4.9% (w/v), in a 3-L fermenter (Bioflo 110, New Brunswick Scientific), at 30°C for 96 h. The pH was controlled at 5.2 with 5 M NaOH, the agitation was set at 50–70 rpm to keep the fermentation broth homogeneous, and nitrogen gas (0.2 L h^{-1}) was sparged through the headspace continuously to maintain anaerobic conditions.

EPS production by *L. mesenteroides* RTF10 was carried out in medium supplemented with sucrose (0.8%) instead of glucose as carbohydrate source, and cultures were incubated for 12 h at 30°C until $\text{OD}_{600} = 1.0$. *L. suebicus* CUPV225 was grown in the SMD medium (pH 5.5) for 72 h at 28°C in an atmosphere containing 5% CO_2 until $\text{OD}_{600} = 3.4$.

2.3. Production of EPS by *L. lactis* NZ9000[pNGTF]

A frozen culture of the recombinant strain was used after thawing to inoculate 1 L of CDM medium supplemented with glucose (0.5%) and chloramphenicol ($5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). The culture was grown at 30°C to $\text{OD}_{600} = 0.6$. Then, it was centrifuged at $6816 \times g$ for 20 min at 4°C and re-suspended in fresh CDM medium without antibiotic. For EPS production, expression of *gtf* gene was induced by the addition of nisin (0.25 ng mL^{-1}) and further incubation during 24 h at 30°C . Batch fermentation without pH control was performed.

2.4. EPS isolation and purification from *P. parvulus* 2.6 culture supernatant

Bacterial cells were removed from fermented media by centrifugation at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The clear supernatant was collected and the EPS precipitated by adding three volumes of cold absolute ethanol, and maintained overnight at 4°C . The precipitate was recovered by centrifugation at $14,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The resulting EPS pellet was dissolved in ultrapure water, and the EPS was recovered by precipitation with ethanol (three times). The final precipitate was dissolved in and dialysed for 2 days against ultrapure water (changed twice each day), using a dialysis membrane (Medicell International, Ltd., London, U.K.) having a cut-off of 12–14 kDa. After dialysis, the solution was frozen at -80°C and lyophilized (Telstar Cryodos equipment, Spain) at -50°C for up to 3 days to completely remove the solvent. The lyophilized solid was then stored in a desiccator at room temperature. To eliminate impurities the EPS preparation was fractionated by size-exclusion chromatography (SEC). Dry EPS was dissolved in 0.3 M NaOH (to eliminate extra contaminants and to improve the EPS dissolution) and centrifuged to eliminate insoluble material. The supernatant was loaded into a column ($60\text{ cm} \times 2.6\text{ cm}$) of Sepharose CL-6B equilibrated with 0.3 M NaOH, which was also used as eluent (0.3 mL min^{-1}). Fractions were collected, and monitored for carbohydrate content by the phenol-sulphuric acid method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). A calibration curve was obtained by using standards (Blue Dextran; Dextran: T500, T70, and T10 (Pharmacia), and vitamin B12). From this curve, the

apparent molecular mass (M_r) of the EPS was estimated. The fractions corresponding to the same chromatographic peak were pooled together, concentrated to a small volume, dialysed against ultrapure water using a dialysis membrane (12–14 kDa cut-off) until neutrality, and, after freezing, lyophilized for up to 3 days.

2.5. EPS isolation and purification from *L. suebicus* CUPV225 culture supernatant

Bacterial cells were removed from fermented medium by centrifugation at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The clear supernatant was collected and the EPS precipitated by adding three volumes of cold absolute ethanol. A floating fraction was first removed by winding around a glass rod and resuspended in ultrapure water (fraction H). The remaining cloudy ethanol mixture was maintained overnight at 4°C , then centrifugation at $11,000 \times g$ for 30 min at 4°C to collect the suspended polysaccharide material (fraction L). This fraction was washed 3 times with 70% (v/v) ethanol and centrifuged. The floating and precipitated polysaccharides were re-suspended in and dialysed against ultrapure water, using a membrane (12–14 kDa cutoff), for 2 days (changed twice). After dialysis, both fractions were frozen at -80°C and lyophilized for up to 3 days. The floating fraction (H) was very insoluble and was not further analyzed. Fraction L was subjected to SEC and the M_r of the EPS was estimated as described in Section 2.4.

2.6. EPS isolation and purification from *L. mesenteroides* RTF10 culture supernatant

Cells were removed from culture supernatant by centrifugation at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C . Then, cold absolute ethanol (v/v) was added to the supernatant, allowing the EPS to precipitate at 4°C for 24 h. After centrifugation at $10,651 \times g$ for 60 min at 4°C , the supernatant was removed, and the EPS was re-suspended in and dialysed for 2 days against ultrapure water (changed twice), using a membrane (12–14 kDa cutoff). The EPS was frozen at -80°C and lyophilized for up to 3 days. The dry biopolymer was dissolved in ultrapure water and centrifuged to eliminate insoluble material. The supernatant was loaded into a column (60 cm \times 2.6 cm) of Sepharose CL-6B equilibrated with ultrapure water, which was also used as eluent (0.3 mL min^{-1}). The M_r of the EPS was estimated as described in Section 2.4.

2.7. EPS isolation and purification from *L. lactis* NZ9000[pGTF] supernatants

To improve the release of EPS from bacterial surface, the cultures were heated at 60°C for 20 min in a water bath. Then, for removal of the bacteria, the culture was centrifuged at $10,651 \times g$ for 60 min at 4°C . The EPS present in the supernatant was recovered by overnight precipitation at -20°C with three volumes of absolute ethanol and re-suspension in ultrapure water (three times). After each precipitation, the EPS was recovered by centrifugation at $10,651 \times g$ for 60 min at 4°C . Then, the precipitate was re-suspended in and dialysed for 2 days against ultrapure water (changed twice) in a membrane (12–14 kDa cutoff). The EPS was frozen at -80°C and lyophilized for up to 3 days. The dry biopolymer, after being dissolved in 0.3 M NaOH, was subjected to SEC and its M_r was estimated as described in Section 2.4.

2.8. Determination of EPS concentration and presence of contaminants

The concentration of EPS in the different steps of purification was estimated as neutral carbohydrate content determined by the phenol–sulphuric acid method (Dubois et al., 1956). The amount

of EPS was determined from culture supernatants: (i) after concentration, precipitation with two volumes of absolute ethanol (to remove the carbon source added to the medium), and washing of the EPS with 70% (v/v) ethanol, vacuum drying and suspension in water; (ii) after precipitation with ethanol, dialysis, freeze-drying and EPS suspension in water (solutions 1 or 2 mg mL^{-1} , depending on their solubility); and (iii) after chromatographic purification, dialysis, freeze-drying and resuspension in 1 or 2 mg mL^{-1} water solutions of the EPS. Contamination by DNA, RNA, and proteins was measured with the Qubit® 2.0 fluorometer in the same solutions for the purified samples or directly from the culture supernatant. This technique allows the detection of more than $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of DNA, 20 ng mL^{-1} of RNA, and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of proteins.

2.9. Detection of EPS by electron microscopy

The presence of the EPS attached to the bacteria either capsular, tightly associated with the cell surface, and/or as slime or rope secreted into the extracellular environment, was determined by transmission electron microscopy (TEM) using either the ruthenium red staining method (Akin & Rigsby, 1990) or by negative staining with uranyl acetate (Maeyama, Mizunoe, Anderson, Masao Tanaka, & Matsuda, 2004). (i) The ruthenium red staining method was used for *L. mesenteroides* RTF10 basically as described by Akin and Rigsby (1990). The bacterium was grown to early stationary phase in MRS medium (Pronadisa, Madrid, Spain) at 30°C . Cells were sedimented by centrifugation, washed in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4), and concentrated fivefold in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4). Cells were fixed in freshly prepared 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), embedded in 2% agarose, and sections were cut with a scalpel. Cells were post fixed in 1.5% (w/v) OsO_4 in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) containing 0.075% (w/v) ruthenium red. Then, they were washed three times in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), dehydrated using a graded ethanol series (30, 50, 70, 95, and 100% ethanol, 5 min each), and embedded in epoxy resin. Thin sections (60 nm) were made with a Diatome glass knife, using an Ultracut Leica UC6 ultramicrotome and examined with a JEOL JEM1010 transmission electron microscope after uranyl acetate staining. Images were captured and digitized using a MegaView III camera with Software "AnalySIS". (ii) The negative staining with uranyl acetate was used for *P. parvulus* 2.6, *L. suebicus* CUPV225, *L. lactis* NZ9000[pNGTF], and for purified EPSs. *P. parvulus* 2.6 and *L. suebicus* CUPV225 were grown to early stationary phase in MRS medium at 30°C and *L. lactis* NZ9000[pNGTF] cultures were induced with nisin for 24 h as indicated in section 2.3. The EPS previously purified from *L. lactis* NZ9000[pNGTF] was re-suspended in PBS pH 7 at 1 mg mL^{-1} prior to negative staining. Samples were prepared as follows. Glow-discharged carbon-coated Formvar grids were placed facedown over a droplet of each culture concentrated fivefold in 0.1 M NH_4Ac , pH 7 or PBS pH 7. After 1 min, each grid was removed, blotted briefly with filter paper, and without being dried, negatively stained with 2% uranyl acetate for 40 s and then blotted quickly and air-dried. Samples were examined using a JEOL 1230 transmission electron microscope operated at 100 kV. Images were digitalized using an Epson Perfection 4870 Photo scanner at 1200 dpi final resolution.

2.10. Infrared (IR) spectroscopy

IR spectra were obtained by the KBr technique. In brief, approximately 2 mg of dry sample were thoroughly mixed in a mortar with 300 mg of KBr and maintained in a desiccator. The pellet was prepared by using a hydraulic press, applying a pressure of 2 tons for 2 min and then 10 tons for 6 min. The spectra were recorded in a FTIR 4200 type A instrument (Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

Light source of transmittance was in the middle range infrared 400–4000 cm⁻¹. The detector used was triglycine-sulfate (TGS) with resolution 4 cm⁻¹.

2.11. Determination of monosaccharide composition and phosphate content

For analysis of neutral sugars, the polysaccharides (approximately 1 mg) were first hydrolyzed with 3 M TFA (121 °C, 1 h). The monosaccharides were converted into their corresponding alditol acetates by reduction with NaBH₄ and subsequent acetylation (Laine, Esselman, & Sweeley, 1972). Identification and quantification were performed by gas-liquid chromatography (GLC) on a 6890A instrument (Agilent) equipped with a flame-ionization detector, using a HP5 fused silica column (30 m × 0.25 mm I.D. × 0.2 μm film thickness) with He as the carrier gas. Injector and detector were set at 250 °C. Samples (1 μL) were injected with a split ratio of 1:50, with a temperature program: 160 °C for 5 min, then 3.5 °C min⁻¹ to 205 °C and finally 210 °C for 0.5 min. Identification was performed on the basis of the coincidence of the retention time of sample components with those previously measured for standards analyzed in identical conditions, using inositol as internal standard. Phosphate content was deduced from inorganic phosphate determination on a 5500 Inductively Coupled Plasma instrument (Perkin Elmer).

2.12. Methylation analysis

The polysaccharides (1–5 mg) were methylated according to the method of Ciucanu and Kerek (1984). The permethylated polysaccharides were hydrolyzed with 3 M trifluoroacetic acid (TFA) at 121 °C for 1 h. The resulting partially methylated monosaccharides were converted into their corresponding alditol acetates by reduction with NaBD₄ and subsequent acetylation with 250 μL of pyridine:acetic anhydride (1:1) for 1 h at 100 °C, as described by Laine et al. (1972). The partially methylated alditol acetates obtained were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) on a 6890A/5975C instrument from Agilent, with He as the carrier gas. The injector was programmed at 250 °C. Samples (1 μL) were injected with a split ratio of 1:50 and their components separated in a HP5MS (Agilent) fused silica column (30 m × 0.25 mm I.D. × 0.2 μm film thickness), with a temperature program starting at 160 °C (1 min) and then rising 2 °C min⁻¹ up to 200 °C. An *m/z* range between 40 and 450 amu was scanned. Identification was done on the basis of the retention time and mass spectra of the compounds. Quantification was performed according to peak area.

3. Results and discussion

3.1. Production of EPS by LAB

The amount and composition of the EPS produced by LAB is strongly influenced by culture and fermentation conditions such as pH, temperature, and medium composition (Dueñas, Munduate, Perea, & Irastorza, 2003). In general, higher yields of HoPS and HePS are obtained when complex media are used for bacterial growth. However, the use of these media results in EPS preparations with higher levels of contaminants (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005). Thus, in this work, specific conditions for the production of each EPS produced by different LAB have been set up by using defined or semi-defined media, to diminish, during purification, the co-precipitation of interfering compounds (e.g. polysaccharides from the culture medium) together with the bacterial EPS.

The four strains analyzed secreted variable amounts of EPS into the culture media, as quantified by the phenol sulfuric acid method: *L. suebicus* CUPV225 144 ± 1 mg L⁻¹, *P. parvulus* 2.6 378 ± 3 mg L⁻¹, *L. lactis* NZ9000[pGTF] 561 ± 18 mg L⁻¹, and *L. mesenteroides* RTF10 1870 ± 180 mg L⁻¹. The proportion of the EPS in the supernatants relative to protein, RNA, and DNA contaminants ranged from 9 to 97% from *L. suebicus* CUPV225 to *L. mesenteroides* RTF10 cultures, the highest contamination being due to proteins (Table 1).

The production of the exocellular polymers was also detected by TEM analysis of bacterial cultures (Fig. 1). *P. parvulus* 2.6 (Fig. 1A), *L. lactis* NZ9000[pGTF] (Fig. 1B), and *L. suebicus* CUPV225 (Fig. 1D) preparations revealed their EPS as amorphous masses, either attached to the bacterial cells or free in the preparation. Similarly, the EPS was visualized in aqueous solutions of the purified EPS. As an example, the EPS produced by the recombinant *L. lactis* strain is depicted in Fig. 1C. In the case of *L. mesenteroides* RTF10, the EPS was predominantly concentrated around the exterior of the cells in a putative capsule, with fibrous structures interconnecting adjacent cells. There were also cell-free isolated clumps of EPS in the medium (Fig. 1E). The detection of a low proportion of molecules that were not attached to the cells and the high yield of EPS production by the bacterium indicated that most of the biomolecules produced by *L. mesenteroides* were lost by sedimentation of the bacterial culture prior to TEM analysis.

3.2. Recovery and initial purification of EPS

Bacterial EPS are generally recovered from culture broth by precipitation, by adding a water-miscible organic solvent (Kumar, Mody, & Jha, 2007). Here, ethanol precipitation was used for the recovery and initial purification of EPS from bacterial culture supernatants. The concentration of neutral carbohydrates, protein, DNA, and RNA was analyzed in aqueous solutions of the EPS

Table 1
Detection of biomolecules in successive steps of the purification process.

Strain	Culture supernatant ^b				After precipitation and dialysis ^c				After SEC ^c			
	EPS (%)	Protein (%)	DNA (%)	RNA (%)	EPS (%)	Protein (%)	DNA (%)	RNA (%)	EPS (%)	Protein (%)	DNA (%)	RNA (%)
<i>P. parvulus</i> 2.6	65.3	34.7	0	0	98.5	<0.1	0	0	100	0	0	0
<i>L. lactis</i> NZ9000 [pGTF]	95.5	4.5	<0.1	<0.1	98.5	1.4	<0.1	0	100	0	0	0
<i>L. suebicus</i> CUPV225 ^a	9	83.3	0	7.7	29.6	4	0	7.9	37.3	3	0	0
<i>L. mesenteroides</i> RTF10	97	2.9	<0.1	<0.1	99.1	0.9	<0.1	<0.1	100	0	0	0

^a In addition to neutral sugars, this sample contained phosphate and aminosugars. Consequently, low EPS levels were detected using the phenol-sulfuric acid method, which is appropriate for neutral sugars but not for aminosugars.

^b Protein, DNA and RNA concentrations were measured directly from supernatants. EPS concentration was determined from neutral sugars estimation after ethanol precipitation from culture supernatants. 100% corresponds to the total concentration of detected biomolecules (EPS, protein, RNA, and DNA) in each sample.

^c Solutions were prepared in water at 2 mg mL⁻¹ for *L. mesenteroides* EPS and 1 mg mL⁻¹ for the other EPS.

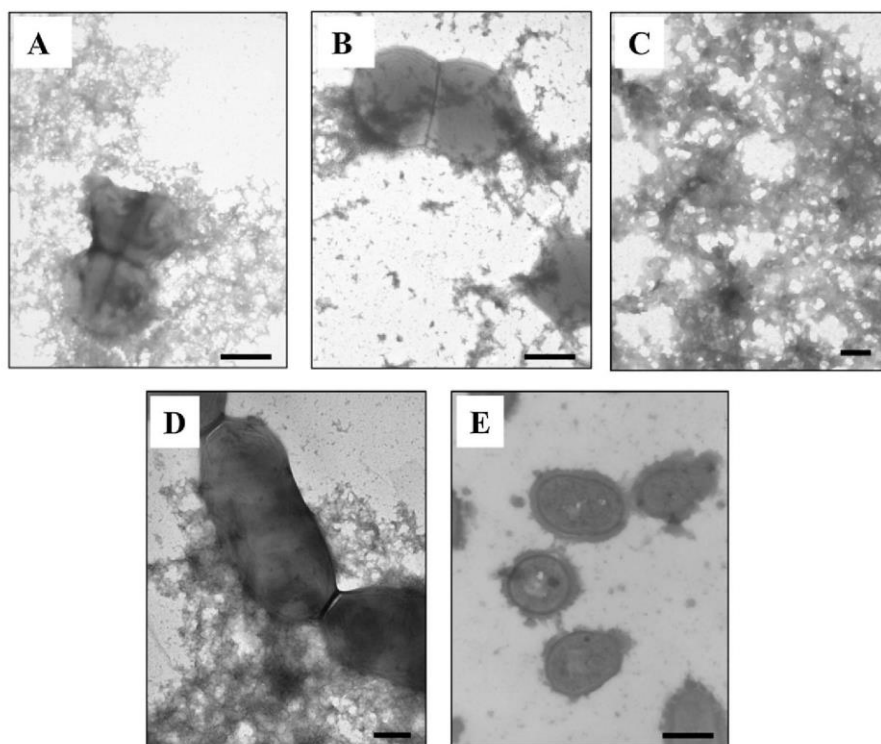


Fig. 1. Transmission electron micrographs of EPS and bacterial cells. Negative staining with uranyl acetate of whole cells of *P. parvulus* 2.6 (A), *L. lactis* NZ9000[pNGTF] (B), and *L. suebicus* CUPV225 (D) as well as of EPS purified from *L. lactis* NZ9000[pNGTF] (C). Ultrathin section of *L. mesenteroides* RTF10 cell stained with ruthenium red (E). All bars correspond to 500 nm except (C), 100 nm.

preparations to check their purity after ethanol precipitation, dialysis, and lyophilisation (Table 1).

The amounts of absolute ethanol needed to achieve the recovery of the EPS from the culture supernatants depended on the type of polymer released. For example, the EPS from *P. parvulus* and the recombinant *L. lactis*, which are β -glucans, needed three volumes of ethanol, while the EPS from *L. mesenteroides* precipitated easily with only one volume of this solvent. In the case of *L. suebicus* two EPS fractions were separated from the culture supernatant, one that precipitated quickly after ethanol addition (fraction H) and other that flocculated after a longer time under cold conditions (fraction L). Fraction H turned out to be very insoluble after drying, and was not further analyzed. In addition, the EPS from *P. parvulus* and *L. lactis*, either directly from supernatants or after initial purification or chromatographic fractionation (see below), generated gel-like solutions at concentrations higher than 3 mg mL^{-1} and had to be diluted to 1 mg mL^{-1} to get a homogeneous suspension. The EPS from *L. mesenteroides*, which was produced in the highest yield and precipitated with the lowest ethanol proportion (1:1, v/v), contained a negligible amount of impurities. A similar yield was observed for the EPS produced by the recombinant *L. lactis* strain, for which optimized polymer production was better controlled. By contrast, the EPS preparations from *P. parvulus* and *L. suebicus* strains had variable amounts of contaminating proteins and nucleic acids.

The results show that purification resulted in all cases in a decrease of protein contamination and it had variable effects to remove the residual DNA and RNA contamination presumably due to cell lysis.

3.3. SEC of the EPS preparations and analysis of sugar composition of the purified EPS

To further purify the polysaccharides and to estimate their average molecular mass, the lyophilized samples were fractionated by SEC after being dissolved in the appropriate solvent, according to their solubility. Thus, for *P. parvulus*, *L. lactis*, and *L. suebicus*, the use of 0.3 M NaOH was required, in order to get a better dissolution of the samples. On the other hand, the more soluble EPS from *L. mesenteroides* was analyzed using a water solution. Analysis of neutral sugar content of EPS preparations, after SEC fractionation, revealed for all isolates a single peak. EPS from *P. parvulus* 2.6, *L. lactis* NZ9000[pGTF], and *L. mesenteroides* RTF10 had a Mr higher than 10^6 Da and were composed exclusively of glucose (results not shown). However, the EPS collected in fraction L from *L. suebicus* CUPV225 had a Mr around 52,000 Da and contained galactose, glucose, and glucosamine in the proportions 1.1:1.8:1, respectively, and 4.5% phosphate. Analysis of EPS, after SEC, did not reveal contamination by RNA and DNA (Table 1). Moreover, protein contamination at the level of 3% was only detected in the *L. suebicus* EPS preparation. As previously mentioned, this HePS was composed of neutral sugars and glucosamine. Since the phenol–sulfuric acid method does not give positive reaction with aminosugars, carbohydrate content in this sample (37.3%) was underestimated by using this technique.

SEC is a chromatographic procedure currently used to purify in one step HePS from fungal cell walls (Leal, Prieto, Bernabé, & Hawksworth, 2010). Moreover, this method has been successfully used to purify extracellular neutral HePS from Bifidobacteria

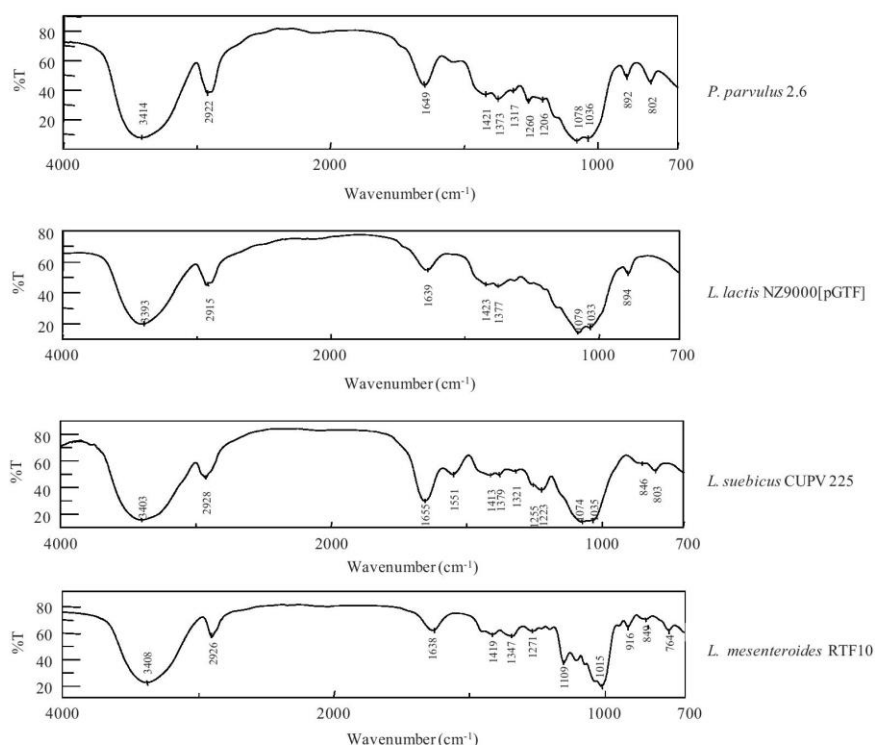


Fig. 2. Infrared spectra of homo- and hetero-polysaccharides synthesized by LAB.

(Salazar, Ruas-Madiedo, Prieto, Calle, & de los Reyes-Gavilán, 2012). Our results validate the use of this method to purify HoPS produced by LAB. However, they show that this method is not sufficient to remove all impurities from the HePS from *L. suebicus*, probably due to interactions of its aminosugars with the Sepharose bed and/or with other components of the preparation. In any case, this fact did not prevent the characterization of the preparation by IR spectroscopy and chemical analysis (see below). Nevertheless, if a high purity HePS is required for further uses, other chemical or enzymatical deproteinization treatments and/or other chromatographic fractionation methods, such as ion exchange chromatography, could be used (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005; Kumar et al., 2007; Freitas, Alves, & Reis, 2011).

3.4. IR spectra of exopolysaccharides

The overall appearance of the spectra (Fig. 2) is typical of those from carbohydrates. Observation of the signals showed similarities and differences among the EPSs analyzed in the present work and allowed certain chemical characteristics of these compounds to be deduced. The spectra from the EPS produced by *P. parvulus* 2.6 and *L. lactis* NZ9000[pGTF] were very similar, displaying an absorption band around 890 cm^{-1} attributable, as expected, to β -anomers. On the other hand, the spectrum from the EPS from *L. mesenteroides* RTF10 did not show this absorption band, but instead had a shoulder at 849 cm^{-1} and a more intense absorption band at 916 cm^{-1} , both characteristic of α -anomers.

The spectrum of the EPS from *L. suebicus* CUPV225 showed two absorption bands, at 1551 and 1655 cm^{-1} , characteristic of the amide linkage, confirming that the glucosamine residues detected by GC were N-acetylated. However, nothing could be clearly

deduced regarding the anomeric configuration of sugars, probably due to the presence of more than one anomeric type in the EPS preparation. Only a slight band at 846 cm^{-1} was observed in the IR spectrum.

3.5. Methylation analysis of exopolysaccharides produced by LAB

Methylation analysis of the polysaccharides (Table 2) proved the similarity of the biopolymers produced by *L. lactis* NZ9000[pGTF] and *P. parvulus* 2.6, giving the expected products for a $(1 \rightarrow 3)$ -glucan partially branched at positions O-2 in agreement with previous results (Dueñas-Chasco et al., 1997; Werning et al., 2008).

The EPS from *L. mesenteroides* RTF10 gave the partially methylated and partially acetylated derivatives of a $(1 \rightarrow 6)$ -glucan with approximately 6% of substitutions at positions O-3 by side chains composed of a single residue of glucose. Since the band for α anomers was observed in the IR spectrum of this polymer, it can be described as a dextran-type polysaccharide. The production of dextrans from *Leuconostoc* strains grown in medium supplemented with sucrose is well known and widely documented (Korakli & Vogel, 2006; Monsan et al., 2001; Sarwat, Qader, Aman, & Ahmed, 2008; Van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen, & Van Geel-Schutten, 2006), although this is the first report on the production of dextrans from a *Leuconostoc* strain isolated from meat.

Finally, the EPS from *L. suebicus* CUPV225 gave a complicated pattern of derivatives from methylation analysis, suggesting that the strain is producing a complex HePS. The possibility of dealing with a mixture of polymers, which eluted together in SEC, cannot be ruled out. Glucose residues were found to be mainly as terminal residues, or $(1 \rightarrow 6)$ -, $(1 \rightarrow 3)$ - and $(1 \rightarrow 4)$ linked, although a small proportion of $(1 \rightarrow 3,6)$ -glucose was also detected. Galactose was mostly found as galactofuranose $(1 \rightarrow 2,6)$ -linked. Aminosugars

Table 2

Linkage types and their percentages, deduced from methylation analysis of homo and hetero-polysaccharides synthesized by LAB and purified by SEC.

Linkage type	<i>P. parvulus</i> 2.6	<i>L. lactis</i> NZ9000 [pGTF]	<i>L. mesenteroides</i> RTF10	<i>L. suebicus</i> CUPV 225
Galp-(1→	0.0	0.0	0.0	6.4
GalF-(1→	0.0	0.0	0.0	2.9
→2)-Galp-(1→	0.0	0.0	0.0	3.4
→6)-GalF-(1→	0.0	0.0	0.0	3.4
→2,6)-GalF-(1→	0.0	0.0	0.0	14.4
Glcip-(1→	30.1	31.1	6.3	24.7
→3)-Glcip-(1→	37.9	36.7	0.0	17.5
→4)-Glcip-(1→	0.0	0.0	0.0	7.0
→6)-Glcip-(1→	0.0	0.0	86.5	15.4
→3,6)-Glcip-(1→	32.0	32.2	7.2	4.7

were detected as non-methylated compounds, probably due to an incomplete dissolution of the sample in DMSO.

4. Conclusions

In this work we have used a combination of conditions to produce and purify high yields of homo- and hetero-polysaccharides from LAB. The strategy was based on identifying defined or semi-defined media as well as growth conditions to minimize contamination by other carbohydrates and bacterial molecules. Moreover, experimenting with different conditions of ethanol precipitation of high molecular mass EPS, which seems to depend on EPS composition and conformation, led to simple isolation methods suitable for determination of their primary structure. In addition, the method was combined with dialysis to remove low molecule weight contaminants such as residual media components and metabolites. The final purification of the EPS preparations was achieved by chromatographic SEC eluting with 0.3 M NaOH in all cases except for the α -glucan, which had good solubility in water. This method yielded pure HoPS and a partially purified HePS. In addition, chemical analyses have allowed us to describe a dextran-producing *L. mesenteroides* strain from a fermented meat product as well as a heteropolysaccharide-producing *L. suebicus* strain isolated from cider, whose HePS merits further investigation.

Acknowledgements

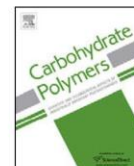
This study was supported by grants AGL2009-12998-C03 and CSD2007-00063 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, ACOMP/2009/257 from the Generalitat Valenciana, and IT335-10 from the Basque Government. M. N-V and S. N. are the recipients of JAE pre-doctor grants from the “Consejo Superior de Investigaciones Científicas” (CSIC). We thank the Microscopy Services from CIB and University of Valencia for technical support and Dr. Stephen Elson for the critical reading of the manuscript.

References

- Akin, D. E., & Rigsby, L. L. (1990). Preservation of ruminal bacterium capsules by using lysine in the electron-microscopy fixative. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2933–2935.
- Bounaix, M.-S., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Rernaud-Simeon, M., Gabriel, B., et al. (2010). Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 1–9.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131(2), 209–217.
- Chenoll, E., Macián, M. C., Elizaquível, P., & Aznar, R. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: Population analysis by rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 498–508.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., et al. (2006). Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9873–9881.
- Dols-Lafargue, M., Lee, H. Y., Le Marrec, C., Heyraud, A., Chambat, G., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species

- commonly found in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4079–4090.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Mateo, P. T., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A., et al. (1997). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*, 303(4), 453–458.
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A., & Gil-Serrano, A. M. (1998). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydrate Research*, 307(1–2), 125–133.
- Dueñas, M., Munduate, A., Perea, A., & Irastorza, A. (2003). Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 113–120.
- Elizaquível, P., Sánchez, G., Salvador, A., Fiszman, S., Dueñas, M. T., López, P., et al. (2011). Evaluation of yogurt and various beverages as carriers of lactic acid bacteria producing 2-branched (1,3)-beta-D-glucan. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3271–3278.
- Fernández de Palencia, P., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Corbí, A. L., et al. (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4887–4891.
- Fraga Vidal, R., Martínez, A., Moulis, C., Escalier, P., Morel, S., Rernaud-Simeon, M., et al. (2011). A novel dextranucrase is produced by *Leuconostoc citreum* strain B/110-1-2: An isolate used for the industrial production of dextran and dextran derivatives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1499–1506.
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398.
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E., & Gaenzle, M. (2010). Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5834–5841.
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E. K., & Gänzle, M. G. (2011). Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiology*, 28(3), 547–553.
- Garañi-Ibabe, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M. L., López, P., et al. (2010). Naturally occurring 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology*, 101(23), 9254–9263.
- Gueimonde, M., Frias, R., & Ouwehand, A. C. (2006). Assuring the continued safety of lactic acid bacteria used as probiotics. *Biologia*, 61(6), 755–760.
- Hongpattarakere, T., Chertong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., & Rastall, R. A. (2011). *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846–852.
- Ibarburu, I., Soria-Díaz, M. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., Velasco, S. E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A. M., et al. (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* 14 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 477–486.
- Kearney, N., Stack, H. M., Tobin, J. T., Chaurin, V., Fenelon, M. A., Fitzgerald, G. F., et al. (2011). *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 producing recombinant beta-glucan positively influences the functional properties of yoghurt. *International Dairy Journal*, 21(8), 561–567.
- Korakli, M., Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 958–965.
- Korakli, M., & Vogel, R. F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 790–803.
- Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H., Dondorf, M. M. G., Kirsanovs, S., van der Maarel, M., & Dijkhuizen, L. (2004). Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: Isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology-SGM*, 150, 3681–3690.
- Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – A perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103–117.

- Laine, R. A., Esselman, W. J., & Sweeley, C. C. (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *Methods in Enzymology*, 28, 159–167.
- Lambo-Fodje, A. M., Leeman, M., Wahlund, K. G., Nyman, M., Oste, R., & Larsson, H. (2007). Molar mass and rheological characterisation of an exopolysaccharide from *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 577–586.
- Leal, J. A., Prieto, A., Bernabé, M., & Hawksworth, D. L. (2010). An assessment of fungal wall heteromannans as a phylogenetically informative character in ascomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 986–1014.
- Liu, C.-F., Tseng, K.-C., Chiang, S.-S., Lee, B.-H., Hsua, W.-H., & Pan, T.-M. (2011). Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2284–2291.
- Llaubères, R. M., Richard, B., Lonvaud, A., Dubourdieu, D., & Fournet, B. (1990). Structure of an exocellular beta-D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research*, 203(1), 103–107.
- Maeyama, R., Mizunoe, Y., Anderson, J. M., Masao Tanaka, M., & Matsuda, T. (2004). Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 70(2), 274–282.
- Martensson, O., Björklund, M., Lambo, A. M., Dueñas-Chasco, M., Irastorza, A., Holst, O., et al. (2005). Fermented, rory, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutrition Research*, 25(5), 429–442.
- Martensson, O., Oste, B., & Holst, O. (2002). The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Research International*, 35(8), 775–784.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., & Remaud-Simeon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675–685.
- Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843–856.
- Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Prieto, A., Calle, L. P., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2012). Characterization of exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* NB667 and its cholate-resistant derivative strain IPLA B667dCo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 1028–1035.
- Sánchez, C., Neves, A. R., Cavalheiro, J., dos Santos, M. M., García-Quintans, N., López, P., et al. (2008). Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1136–1144.
- Sarwat, F., Qader, S. A., Aman, A., & Ahmed, N. (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), 379–386.
- Seymour, F. R., & Knapp, R. D. (1980). Structural-analysis of dextrans, from strains of *Leuconostoc* and related genera, that contain 3-O- α -D-glucosylated alpha-D-glucopyranosyl residues at the branch-points, or in consecutive, linear positions. *Carbohydrate Research*, 81(1), 105–129.
- Tiekink, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Ganzle, M. G., & Vogel, R. F. (2003). *In situ* production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 945–952.
- Van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., & Van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157–176.
- Velasco, S., Arskold, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Radstrom, P., et al. (2006). Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 252–258.
- Velasco, S. E., Areizaga, J., Irastorza, A., Dueñas, M. T., Santamaría, A., & Muñoz, M. E. (2009). Chemical and rheological properties of the beta-glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1827–1834.
- Velasco, S. E., Yebra, M. J., Monedero, V., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., & Irastorza, A. (2007). Influence of the carbohydrate source beta-glucan production and enzyme activities involved in sugar metabolism in *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 325–334.
- Waldherr, F. W., & Vogel, R. F. (2009). Commercial exploitation of homo-exopolysaccharides in non-dairy food systems. In M. Ullrich (Ed.), *Bacterial polysaccharides: Current innovations and future trends* (pp. 313–332). Norfolk: Caister Academic Press.
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269–274.
- Werning, M. L., Corrales, M. A., Prieto, A., Fernández de Palencia, P., Navas, J., & López, P. (2008). Heterologous expression of a position 2-substituted (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5259–5262.
- Werning, M. L., Dueñas, M. T., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Navas, J., et al. (2006). *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*, 69(1), 161–169.



Short communication

Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1–3)- β -D-glucan from *P. parvulus* 2.6Sara Notararigo¹, Mateo de las Casas-Engel¹, Pilar Fernández de Palencia, Angel L. Corbí, Paloma López^{*}

Department of Molecular Microbiology and Infection Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2013

Received in revised form 26 May 2014

Accepted 27 May 2014

Available online 4 June 2014

Keywords:

2-Substituted (1–3)- β -D-glucan

Exopolysaccharides

Macrophages modulation

Lactic acid bacteria

ABSTRACT

β -glucans produced by eukaryotic cells and by microorganisms are known to modulate immune responses by affecting macrophage activation. Here, we have investigated the effect of purified 2-substituted (1–3)- β -D-glucan, produced by either *Pediococcus parvulus* 2.6 or *Lactococcus lactis* NZ9000[pNGTF], on the effector functions of human PMA-differentiated THP-1 cells and M1 pro-inflammatory monocyte-derived macrophages. The results reveal that this kind of β -D-glucan activates macrophages and has an anti-inflammatory effect.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the intestinal wall there is a crosstalk between the epithelial mucosa and the underlying immune system cells. When this is disturbed, the immune cells may release pro-inflammatory cytokines. Chronic gut inflammation, as in Crohn's disease or ulcerative colitis, is a debilitating condition with a high prevalence in developed countries (Loftus, 2004). Polysaccharides are of interest as regulators of the inflammatory responses in these pathologies (Cho, 2008). For example, β -glucans synthesized by microorganisms and eukaryotic cells have been shown to exert a potent immunomodulatory activity (Brown & Gordon, 2001; Robinson, Hale, & Carlin, 2006). The activation of macrophages, dendritic cells and natural killer cells by β -glucans is mediated by specific receptors (Smiderle et al., 2013) including dectin 1 (Brown & Gordon, 2001), Toll-like

receptors TLR-2 and TLR-6, and complement receptor CR3 (Chan, Chan, & Sze, 2009). β -Glucan recognition by these receptors triggers a variety of intracellular signaling cascades which ultimately modulate the link between the innate and the adaptive immune systems.

The chemical structure of β -glucans consists of a linear backbone composed of glucose residues linked by (1–3) bonds (in yeast, oat, and bacteria) or (1–6) bonds (in various fungi), with branching located at position 6 (1–6) or 4 (1–4) of the main chain (Wasser, 2002). The different β -glucan linkages significantly affect solubility, mode of action and biological activity. Some linear and branched β -glucans have been characterized as immunomodulators (Chen & Seviour, 2007). The role of 2-substituted (1–3)- β -D-glucan has only been investigated recently. These polymers are bacterial exopolysaccharides (EPS) synthesized by GTF glycosyltransferase (Werning et al., 2008) and we have previously shown that EPS-producing *Pediococcus* and *Lactobacillus* strains modulate monocyte-derived macrophage effector functions (Fernández de Palencia et al., 2009; Garai-Ibabe et al., 2010). However, these studies did not prove that these modulations were specifically due to their EPS.

Thus, in the present study we have performed a comparative analysis of the effect of purified 2-substituted (1–3)- β -D-glucan derived from strains expressing the pediococcal GTF glycosyltransferase, the parental strain *Pediococcus parvulus* 2.6 (Dueñas-Chasco et al., 1997) and the recombinant strain *Lactococcus lactis* NZ9000[pNGTF] (Werning et al., 2008) on human macrophages.

Abbreviations: EPS, exopolysaccharide; EPS L, 2-substituted (1–3)- β -D-glucan from *L. lactis* NZ9000[pNGTF]; EPS P, 2-substituted (1–3)- β -D-glucan from *P. parvulus* 2.6; LPS, *Escherichia coli* lipopolysaccharide; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA-THP-1, differentiated THP-1; PBMC, human peripheral blood mononuclear cell; SEC, size exclusion chromatography; XTT, 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanil.

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 91 837 31 12; fax: +34 91 536 04 32.

E-mail addresses: sikelia@cib.csic.es (S. Notararigo), [mcasas@cib.csic.es](mailto:mecasas@cib.csic.es) (M.d.l. Casas-Engel), ppalencia@cib.csic.es (P.F.d. Palencia), acorbi@cib.csic.es (A.L. Corbí), plg@cib.csic.es (P. López).

¹ Both authors contributed equally to the work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.073>

0144-8617/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

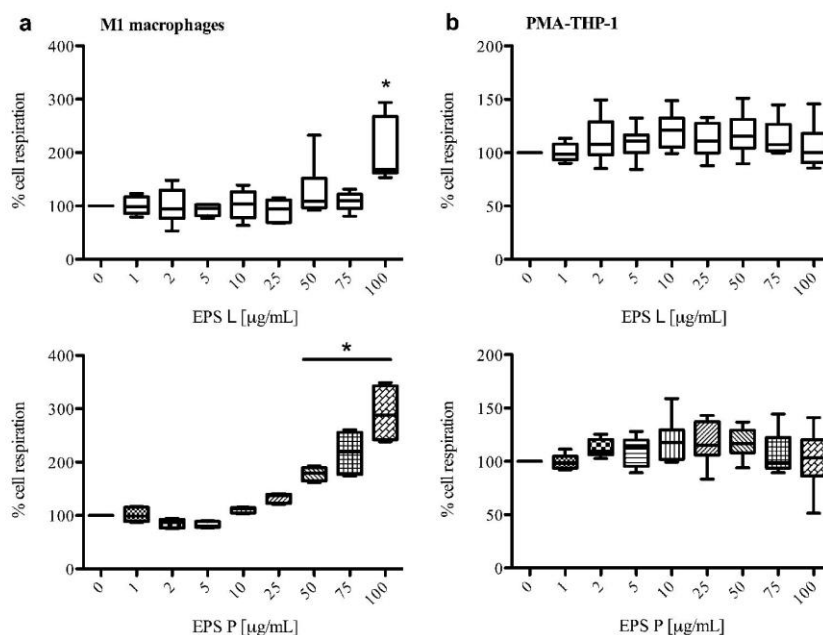


Fig. 1. Cytotoxic effect of EPS L and EPS P on M1 and PMA-THP-1 macrophages. Cells were treated either with EPS L or EPS P at the concentrations indicated in the figure. Data are expressed as mean with standard deviation, median interquartile range (IRQ) and whisker plots (minimum and maximum). Results are presented as a percentage of untreated control samples. * $P < 0.05$ EPS L vs untreated cells; * $P < 0.0001$ EPS P vs untreated cells.

To further validate the analysis, two kind of macrophages were used: pro-inflammatory M1 macrophages generated from human peripheral blood mononuclear cells using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (de las Casas-Engel et al., 2013) and THP-1 cell line differentiated to macrophages by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment (Auwerx, 1991).

2. Materials and methods

2.1. Production and purification of EPS

Two strains were used, both producing the 2-substituted (1–3)- β -D-glucan. *P. parvulus* 2.6 isolated from cider (Dueñas-Chasco et al., 1997), and *L. lactis* NZ9000[pNGTF] recombinant strain, which carries in the pNGTF plasmid, based on the pNZ8040 vector, the *P. parvulus* 2.6 *gft* gene under control of the *PnisA* promoter (Werning et al., 2008). EPS were produced, purified and analyzed as previously described (Notararigo et al., 2013). Briefly, the polymers were obtained from the supernatants of *P. parvulus* (EPS P), and of *L. lactis* (EPS L) cultures by precipitation with ethanol and then purified by size exclusion chromatography (SEC) and dialysis. Contamination by DNA, RNA, and proteins was measured with the Qubit® 2.0 fluorometer (Invitrogen life-technologies). This technique allows the detection of more than $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of DNA, 20 ng mL^{-1} of RNA, and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of proteins.

2.2. Cell cultures

THP-1 cell line was cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco), 100 U mL^{-1} penicillin (Gibco) and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin (Gibco), at 37°C under humidified 5% CO_2 . Differentiated THP-1 (PMA-THP-1) were generated by treatment of THP-1 with 40 nM phorbol 12-myristate 13-acetate PMA (Sigma-Aldrich) for 72 h in the above RPMI 1640 supplemented medium, cells were seeded in a 24 well plate (Falcon)

at a concentration of 5×10^5 cells per well. The treatment led to high morphological similarities to macrophages and cells become adherent to the culture surface due to the reorganization of the receptors of the outer membrane (Auwerx, 1991). After differentiation, non-attached THP-1 cells were removed by aspiration and the adhered macrophages were washed twice with RPMI 1640 medium.

Monocyte-derived M1 macrophages were obtained as follows. Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) gradient according to standard procedures. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The monocytes ($>95\%$ CD14⁺ cells) were cultured at $0.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ for 7 days in RPMI 1640 supplemented with 10% Fetal calf serum medium (Sigma-Aldrich, USA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 , and containing granulocyte macrophages colony-stimulating factor 1000 U mL^{-1} (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) to generate M1 monocyte-derived macrophages. Cytokines were added every 2 days (de las Casas-Engel et al., 2013).

2.3. XTT test

M1 and PMA-THP-1 were analyzed using the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanil (XTT) kit (Hoffman-La Roche). Both human cell types were seeded at a concentration of 1×10^5 per well in a 96 wells plate, and treated for 24 h with either control medium Krebs (Sigma-Aldrich) or Krebs supplemented with different concentrations of EPS L and EPS P. Relative cell viability was determined spectrophotometrically by quantification of the conversion of XTT to formazan, after exposure of the samples to XTT for 3 h (M1) or 4 h (PMA-THP-1).

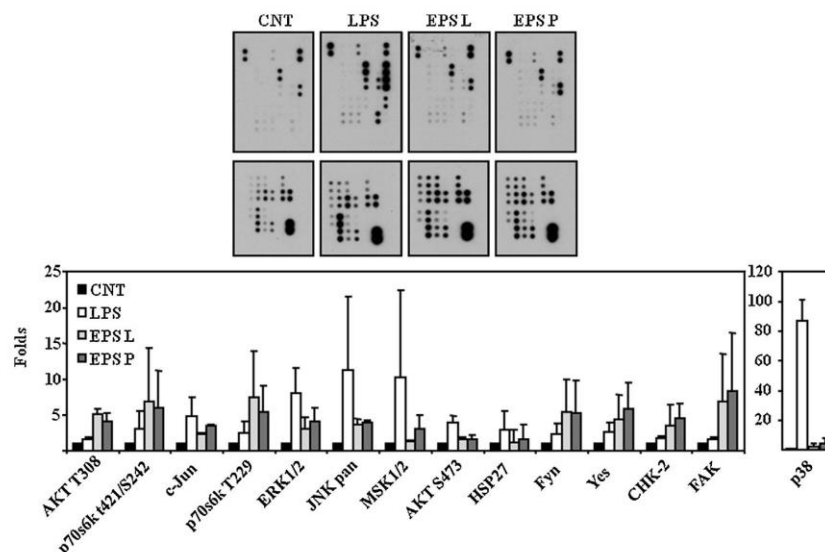


Fig. 2. Screening of intracellular signaling triggered by LPS or EPS in M1 macrophages. M1 macrophages were untreated (CNT) or exposed to LPS, EPS L or EPS P. After lysis, a human phospho-kinase array kit was used to detect the relative levels of kinase phosphorylation. Membrane hybridization (upper panel) and folds of induction of sample vs CNT (lower panel) are depicted.

2.4. Signalling pathway assays

M1 macrophages were exposed for 10 min to *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, Sigma) (10 ng mL^{-1}), EPS L ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) or EPS P ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Macrophages were then immediately lysed and protein phosphorylation of 46 kinases analyzed using the Proteome profiler[®] protein array (R&D Systems, Inc, USA), which detects the phosphorylation state of the serine/threonine/tyrosine kinases according to the specifications of the manufacturers. Membranes were subjected to densitometry and the intensity of each spot (in arbitrary pixel units, a.u.) were normalized using the signal yielded by internal positive controls.

2.5. ELISA test

M1 and PMA-THP-1 were treated 24 h with LPS (10 ng mL^{-1}), EPS L ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) or EPS P ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) and culture supernatants were tested for the presence of cytokines and growth factors using commercially available ELISA for TNF- α , IL-10, and IL-12p40 (OptEIA IL-12p40 set; BD Pharmingen, San Diego, CA) as indicated by the manufacturers.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA USA). Statistical analysis subduced data to D'Agostino & Pearson normality test, furthermore significance of parametric values was obtained with the Student's t-test; while for no parametric values was performed with Wilcoxon test.

3. Results and discussion

For testing the functional effects of 2-substituted (1–3)- β -D-glucan synthesized by the pediococcal GTF glycosyltransferase, EPS were purified from culture supernatants of *P. parvulus* 2.6 and *L. lactis* NZ9000[pNGTF]. Analysis of EPS preparations by SEC, infrared spectroscopy and methylation, as well as monosaccharide

composition, revealed that both purified EPS were 2-substituted (1–3)- β -D-glucan with an average molecular mass of $9.6 \times 10^6 \text{ Da}$ and $6.6 \times 10^6 \text{ Da}$ for EPS P and EPS L, respectively (results not shown). Moreover, analysis of EPS solutions at 1 mg mL^{-1} for purity with the fluorescent Qubit[®] assays did not reveal ($<0.1\%$) the presence of DNA, RNA or proteins.

The EPS were tested by using human pro-inflammatory M1 macrophages derived from buffy coat from normal donors and the PMA-THP-1 cell line. Differentiated THP-1 macrophage-like cells were also used for testing the functional effects of EPS because they exhibit macrophage characteristics *in vitro* (Kohro et al., 2004; Schwende, Fitzke, Ambs, & Dieter, 1996; Tsuchiya et al., 1982). Neither of the two EPS had a deleterious effect on cell viability for either type of macrophage, when their influence was analyzed by the XTT assay (Fig. 1). In this regard, it is important to emphasize that M1 macrophages and PMA-THP-1 cells lack the ability to proliferate (Kohro et al., 2004). Interestingly, the cell respiration rate of M1 macrophages directly correlated with the concentration of tested EPS, since high concentration of EPS P ($50\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$) resulted in a significant increase of the metabolic rate of cells ($P < 0.0001$). This effect was also observed with EPS L at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($P < 0.05$). These results showed a beneficial influence of both EPS in M1 macrophage metabolism though the reason why EPS L is less efficient remains unknown; it could be related to its lower molecular mass. However, no influence of EPS P or EPS L on PMA-THP-1 cells was detected.

To verify the hypothesis that M1 macrophages had been activated by the 2-substituted (1–3)- β -D-glucans, the activation/phosphorylation of several kinases involved in intracellular signaling was explored. The results, indicated that both EPS promote numerous changes in the phosphorylation state of proteins involved in signaling (Fig. 2). In particular, the phosphorylation levels of Fyn, FAK, AKT(T308) and p70S6K were much higher than in untreated cells. The phosphorylation levels of ERK1/2, MSK1/2, AKT (S473) JNKpan and p38 were found to be higher in LPS- than in EPS-treated cells, implying that LPS and EPS trigger different intracellular signals, and confirming that the EPS preparations were devoid of LPS contamination. In fact, no influence of either EPS L or EPS P on the p38 phosphorylation was detected. Therefore,

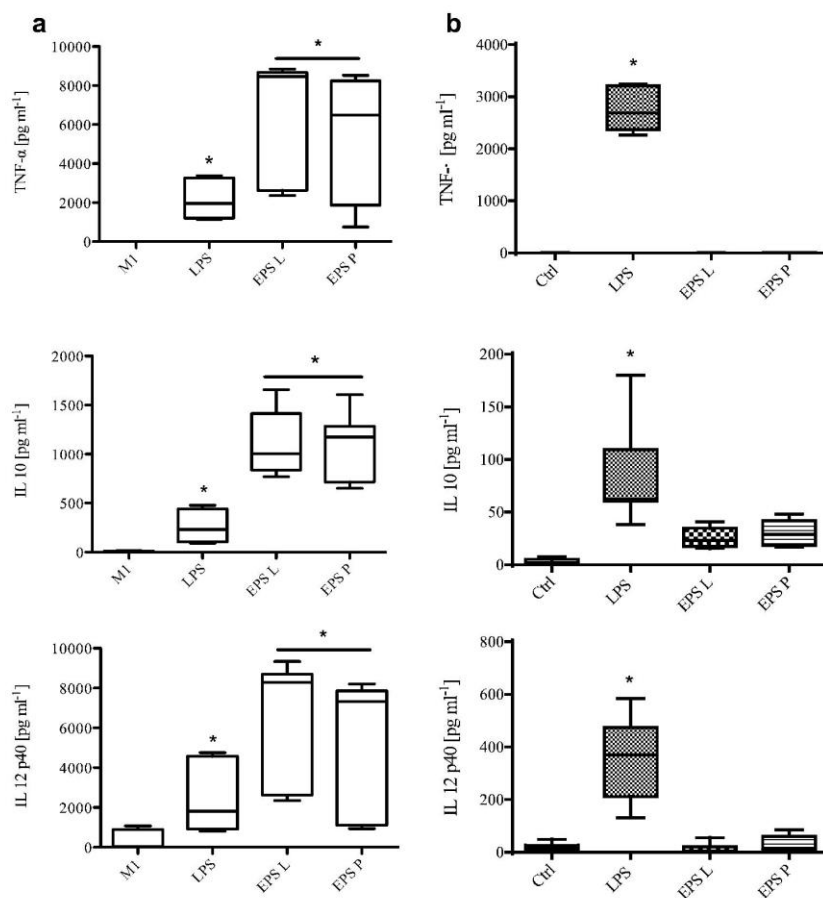


Fig. 3. Comparative analysis of cytokines produced by M1 and PMA-THP-1 macrophages. Cells were treated either with LPS, EPS L or EPS P. Data are represented as box (median and IQR) and whisker plots. The statistical analysis comprehended the comparison of treated vs untreated cells (*). (a) In M1 macrophages, variations of TNF- α , IL-10 and IL-12p40 were statistically significant for LPS (* $P < 0.0001$, $=0.0009$ and <0.05) as well as for EPS L and EPS P (* $P < 0.0009$, <0.0001 and <0.05). (b) In PMA-THP-1 there were statistically significant variations of TNF- α , IL-10 and IL-12p40 for LPS (* $P < 0.0001$, $=0.0078$ and <0.0003) and of TNF- α for EPS L and EPS P (* $P < 0.0001$).

EPS is a weak inducer of JNK and p38 phosphorylation. Since the activation of these two kinase pathways correlates with the acquisition of M1-associated effector functions (Han et al., 2013), our results further support the idea that EPS does not promote the production of pro-inflammatory activities. To understand these differences between LPS and EPS stimuli, the influence of the 2-substituted (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan on macrophage cytokine production (TNF- α , IL-10 and IL-12p40) was investigated. LPS was capable of inducing the production of the three cytokines by either M1 macrophages or PMA-THP-1 cells (Armstrong, Jordan, & Millar, 1996; Saraiva & O'Garra, 2010) (Fig. 3). Regarding EPS, both EPS L and EPS P also significantly triggered the release of the three cytokines by M1 macrophages and at higher levels than the LPS (Fig. 3a). However, comparison of the ratio TNF- α /IL-10 between LPS (107) and the EPS: EPS L (17) and EPS P (10) revealed a more pronounced induction of the TNF- α pro-inflammatory cytokine by LPS. Moreover, both EPS exclusively augmented the production of IL-10 by PMA-THP-1 cells, without significantly affecting the production of either TNF- α or IL-12p40 (Fig. 3b). These results are in agreement with the results of the cell respiration test (Fig. 1), and suggest that EPS preferentially promotes the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10. Previous analysis of the immunomodulatory effect of *P. parvulus* EPS-producer (2.6R) and

non-producer (2.6NR) isogenic strains indicated that the presence of the biopolymer counteracts the pro-inflammatory activation of M1 macrophages in response to the bacterium. (Fernández de Palencia et al., 2009) Thus, the results obtained in this work, showing that in the absence of the producer strain the 2-substituted (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan provokes immunomodulation, provides a new role for the EPS. Finally, comparison of the results obtained with M1 macrophages and PMA-THP-1 cells (Figs. 1 and 3) indicates that to detect the influence of the biopolymer in the latter it is necessary to expose the cells simultaneously to an inflammatory agent such as LPS. Further experiments are required to validate this hypothesis.

4. Conclusions

We have demonstrated that the 2-substituted (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan isolated from the original and the recombinant strains do not have any cytotoxic effect on human macrophages, rather they have an activation effect on the rate of metabolism, which results in the triggering/mobilization of the signal transduction pathway of Fyn, FAK, AKT(T308) and p70S6K. This differed from the results obtained with LPS. Similarly in the induction of the cytokines, TNF- α , IL-10 and IL-12p40, the effect of the β -glucan, differed from that of the positive control (LPS). The possibility that the EPS activates macrophages

by way of TLR-4 has to be discarded as EPS did not stimulate the production of p38.

According to the results obtained in this work with the purified EPS, 2-substituted (1–3)- β -D-glucan continues to be an interesting candidate as a modulator of the immune system and its recombinant origin does not interfere with its immunomodulating properties. Consequently, and in line with previous reports on the probiotic ability of DC-SIGN-binding sugars (Konieczna et al., 2012; Konstantinov et al., 2008; Smits et al., 2005), further studies should be performed to evaluate *ex vivo* and *in vivo* the potential of this biopolymer as co-adjuvant therapy for chronic inflammatory diseases such as Crohn's and inflammatory bowel diseases.

Acknowledgements

We thank Dr Stephen Elson for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness grants AGL2009-12998 and AGL2012-40084.

References

- Armstrong, L., Jordan, N., & Millar, A. (1996). Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*, 51(2), 143–149.
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47(1), 22–31.
- Brown, G. D., & Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 413(6851), 36–37.
- Chan, G. C., Chan, W. K., & Sze, D. M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology and Oncology*, 2(2), 25–36.
- Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1,3), (1,6)-glucans. *Mycological research*, 111(Pt 6), 635–652.
- Cho, J. H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(6), 458–466.
- de las Casas-Engel, M., Domínguez-Soto, A., Sierra-Filardi, E., Bragado, R., Nieto, C., Puig-Kroger, A., Samaniego, R., Loza, M., Corcuera, M. T., Gomez-Aguado, F., Bustos, M., Sanchez-Mateos, P., & Corbí, A. L. (2013). Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. *Journal of Immunology*, 190(5), 2301–2310.
- Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero Mateo, P., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A., & Gil-Serrano, A. M. (1997). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Research*, 303(4), 453–458.
- Fernández de Palencia, P., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Corbí, A. L., & López, P. (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4887–4891.
- Garai-Ibabe, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M. L., López, P., Corbí, A. L., & Fernández de Palencia, P. (2010). Naturally occurring 2-substituted (1,3)- β -D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology*, 101(23), 9254–9263.
- Han, M. S., Jung, D. Y., Morel, C., Lakhani, S. A., Kim, J. K., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science*, 339(6116), 218–222.
- Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., & Kodama, T. (2004). A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 11(2), 88–97.
- Konieczna, P., Groeger, D., Ziegler, M., Frei, R., Ferstl, R., Shanahan, F., Quigley, E. M., Kiely, B., Akdis, C. A., & O'Mahony, L. (2012). *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: Potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut*, 61(3), 354–366.
- Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C. M., Singh, S. K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T. R., & van Kooyk, Y. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19474–19479.
- Loftus, E. J. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6), 1504–1517.
- Notararigo, S., Nacher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M. L., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M. T., Aznar, R., López, P., & Prieto, A. (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 57–64.
- Robinson, C. M., Hale, P. T., & Carlin, J. M. (2006). NF- κ B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . *Cytokine*, 35(1–2), 53–61.
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181.
- Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., & Dieter, P. (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Journal Leukocyte Biology*, 59(4), 555–561.
- Smiderle, F. R., Alquini, G., Tadra-Sfeir, M. Z., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Van Griensven, L. J. (2013). *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1,6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 91–99.
- Smits, H. H., Engering, A., van der Kleij, D., de Jong, E. C., Schipper, K., van Capel, T. M., Zaat, B. A. J., Yazdanbakhsh, M., Wierenga, E. A., van Kooyk, Y., & Kapsenberg, M. L. (2005). Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(6), 1260–1267.
- Tschiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., & Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Research*, 42(4), 1530–1536.
- Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274.
- Werning, M. L., Corrales, M. A., Prieto, A., Fernández de Palencia, P., Navas, J., & López, P. (2008). Heterologous expression of a position 2-substituted (1,3)- β -D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 74(16), 5259–5262.

Capítulo 5D en “Bacterias lácticas: conocimientos y aplicaciones”.
Editores: Victor Rivera y Djamel Drider. (En prensa.)
Alfaomega Grupo editor S. A. Mejico D. F.

APLICACIONES DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS EN LA CALIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LOS ALIMENTOS

MONTERRAT NÁCHER VÁZQUEZ^{1,2}, IDOIA IBARBURU LÓPEZ³, SARA NOTARARIGO¹, PILAR FERNÁNDEZ DE PALENCIA DELGADO¹, ROSA AZNAR NOVELLA^{2,4}, M^a TERESA DUEÑAS CHASCO³, PALOMA LÓPEZ GARCÍA¹

¹*Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España.*

²*Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC. Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, España.*

³*Departamento de Química Aplicada. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Paseo Manuel de Lardizábal 3, 20018 Donostia, España.*

⁴*Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. Av. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, España.*

5D.1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen una gran importancia industrial como bacterias iniciadoras o coadyuvantes en la producción de alimentos fermentados producidos a nivel industrial, tales como derivados lácteos, cárnicos fermentados y masas panarias. Así mismo, en alimentos fermentados artesanales producidos a pequeña escala, las poblaciones naturales de BAL dominan el proceso de fermentación confiriendo características singulares al producto. Además, algunas BAL presentan características beneficiosas para la salud (propiedades probióticas) o capacidades metabólicas extraordinarias como son la producción de enzimas (i.e. amilasas, fitasas), vitaminas (i.e. folatos, riboflavina) o exopolisacáridos (EPS), de especial interés para la industria agroalimentaria y para la formulación de nuevos alimentos funcionales (revisado por Anastasio *et al.*, 2010; Badel *et al.*, 2011; Capozzi *et al.*, 2012). Por otro lado, la capacidad de las BAL para producir bacteriocinas las convierte en candidatos para su aplicación como bioconservantes (ver detalles en el capítulo 5E de este libro).

Muchas de las especies de BAL tienen el *status* de GRAS “Generally Recognized As Safe” según la Administración Norteamericana de Alimentos y Drogas (FDA) o QPS “Qualified Presumption of Safety” según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) lo que facilita su aplicación en alimentos y, por tanto, suscita su interés industrial.

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos que, más allá de su valor nutricional básico, ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Entre ellos se encuentran los alimentos probióticos, que contienen cultivos bacterianos u otros microorganismos no patógenos que después de ser ingeridos ejercen beneficios para la salud y promueven una microbiota intestinal saludable. Muchos de estos alimentos están elaborados con BAL y gozan actualmente de un amplio mercado que se encuentra en continua expansión.

Las BAL con capacidades metabólicas extraordinarias presentan un elevado potencial en la elaboración/formulación de nuevos alimentos funcionales de alto valor añadido (revisado por Zanini *et al.*, 2012). Los estudios actuales sobre su aplicación en funcionalidad de alimentos demuestran que BAL productoras de fitasas pueden mejorar la solubilización de minerales en masas ácidas durante la fermentación panaria (Anastasio *et al.*, 2010) y BAL superproductoras de riboflavina pueden utilizarse para elaborar pan y pasta enriquecidos en vitamina B₂ (revisado por Capozzi *et al.*, 2012). Además, algunas BAL sintetizan EPS que son secretados al medio, mejorando las características sensoriales y tecnológicas de varios productos fermentados, fundamentalmente productos lácteos y los basados en cereales. BAL productoras de heteropolisacáridos (HePS) mejoran la viscosidad y textura de leches fermentadas, tales como yogurt, kéfir y queso con bajo contenido en grasa (revisado por Badel *et al.*, 2011). Algunas cepas de BAL productoras de otro tipo de EPS, los homopolisacáridos (HoPS), mejoran las propiedades viscoelásticas de masas ácidas, que podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores para reducir el uso de hidrocoloides, como aditivos texturizantes, en la elaboración de productos de panadería. Por otro lado, los EPS sintetizados por BAL tienen un gran interés en la industria agroalimentaria dado que se les han atribuido efectos beneficiosos para la salud humana.

Dado el interés biotecnológico de los EPS producidos por las BAL, en este capítulo nos centraremos en su descripción y en la contribución de estos biopolímeros y de sus bacterias productoras en la calidad y funcionalidad de los alimentos.

5D.2 TIPOS DE EXOPOLISACÁRIDOS Y SU ESTRUCTURA

En los últimos años se han aislado diversas estirpes de BAL productoras de EPS a partir de diferentes productos alimentarios (leches fermentadas, yogur, granos de kéfir, cárnicos, cereales fermentados y bebidas alcohólicas). El aislamiento de las bacterias productoras es relativamente sencillo si se cultivan en medio sólido, debido a que las colonias tienen un aspecto mucoso (Figura 5D.1B y 5D.1C) y al ser tocadas con un asa de siembra se levantan como si fueran filamentos (Figura 5D.1D). Así, hemos aislado BAL productoras de HoPS y HePS (Figura 5D.1). Sin embargo, cabe resaltar que para dicha detección es necesaria la presencia en el medio de cultivo del sustrato requerido para la síntesis del EPS (Figura 5D.1B), ya que en ausencia de éste las bacterias muestran un fenotipo no mucoso (Figura 5D.1A).

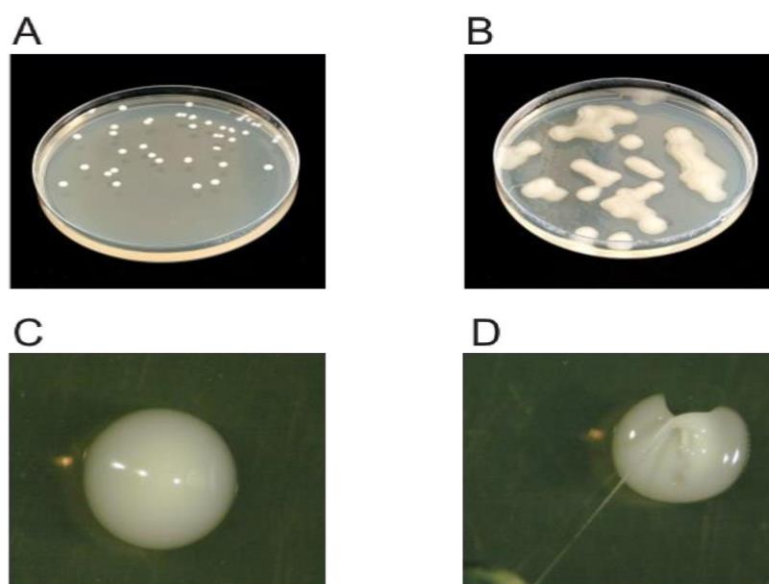


Figura 5D.1 Fotografías de colonias de BAL productoras de EPS. Colonias de *Lactobacillus sakei* aislado de productos cárnicos y productor de α -glucano, cultivado en placas de MRS suplementadas con glucosa (A) y con sacarosa, condición óptima de producción de EPS (B) (Nácher-Vázquez, resultados no publicados). Colonias mucosas de *Lactobacillus suebicus* aislado de sidra ahilada y productor de heteropolisacárido cultivado en medio MRS suplementado con glucosa antes (C) y después (D) de ser levantadas con un asa de siembra (Ibarburu, resultados no publicados).

Los EPS producidos por BAL pueden encontrarse íntimamente ligados a componentes de la superficie celular como los ácidos lipoteicóicos integrados en la pared celular y como estructuras compactas formando cápsulas polisacáridicas. Sin embargo, las BAL también sintetizan otros EPS que están unidos débilmente a la superficie celular o son excretados al ambiente como sustancia mucosa.

Los EPS bacterianos presentan una amplia variabilidad en su composición química, estructura y peso molecular. En función de su composición química, se clasifican en HoPS, constituidos por un único tipo de monosacárido, y HePS formados por dos o más tipos de monosacáridos. En la síntesis de los HePS intervienen enzimas glicosiltransferasas específicas unidas a membrana que polimerizan las unidades repetitivas, sintetizadas a nivel de membrana en su lado citoplasmático. Las glicosiltransferasas están codificadas por genes incluidos en operones o unidades mayores (clusters) junto a los genes que determinan la longitud de cadena, su polimerización y secreción, así como los que regulan su síntesis. Sin embargo, en el caso de los HoPS tan sólo se requiere una enzima, codificada por un solo gen para la síntesis del polímero, y en la mayoría de los casos, la proteína anclada a la membrana cataliza la síntesis extracelularmente (revisado por Werning *et al.*, 2012).

Los HoPS producidos por BAL pueden dividirse a su vez en glucanos (α y β) y fructanos (inulina y levanos) compuestos por unidades repetidas de D-glucopiranososa y D-fructopiranososa, respectivamente (Tabla 5D.1).

Los α -glucanos son sintetizados por enzimas pertenecientes a la familia de glucansacarasas que utilizan sacarosa como sustrato. Los fructanos son sintetizados extracelularmente por fructansacarasas utilizando sacarosa como sustrato, mientras que los β -glucanos son sintetizados por la glicosiltransferasa GTF, utilizando UDP-glucosa como sustrato, y posiblemente este enzima es también responsable de su secreción extracelular (revisado por Werning *et al.*, 2012).

Los α -glucanos se pueden clasificar en cinco clases, según el tipo de enlace entre los átomos de carbono de la cadena lineal, y son producidos fundamentalmente por los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. En cuanto a los dextranos, la composición de la cadena principal está mayoritariamente formada por α -(1,6)-D-glucosa ó α -(1,4)-D-glucosa, además pueden presentarse tres tipos de ramificaciones que dan lugar a tres clases de dextranos, según el tipo de enlace involucrado en dicha ramificación (α -(1,2), α -(1,3) ó α -(1,4)). Los α -glucanos están autorizados por la EFSA para su utilización en la industria alimentaria como espesantes, gelificantes y en aplicaciones nutritivas.

Tabla 5D.1 Homopolisacáridos producidos por bacterias lácticas.

Tipos de EPS			Enlace	Ramificaciones	BAL productoras
Glucanos	α -glucanos	Glucano	α -(1,2)		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
		Mutano	α -(1,3)		<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>L. mesenteroides</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>
		Reuterano	α -(1,4)		<i>L. reuteri</i>
		Dextrano	α -(1,6) α -(1,6) α -(1,6)	α -(1,2) α -(1,3) α -(1,4)	<i>L. mesenteroides</i> <i>L. reuteri</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus parabuchneri</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
		Alternano	α -(1,6) + α -(1,3)		<i>L. mesenteroides</i>
	β -glucanos	Glucano	β -(1,3)	β -(1,2)	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <i>L. diolivorans</i> <i>Lactobacillus suebicus</i> <i>Oenococcus oeni</i>
Fructanos		*Inulina	β -(2,1)		<i>L. reuteri</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
		*Levano	β -(2,6)		<i>L. reuteri</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. mutans</i> <i>Lactobacillus pontis</i> <i>Lactobacillus frumenti</i> <i>Lactobacillus panis</i>

*La inulina y el levano existen tanto en la forma lineal como en forma ramificada.

Entre estas últimas cabe destacar que los oligosacáridos y los isomalto-oligosacáridos, que derivan de estos EPS, se ha observado que resisten al proceso digestivo de los animales y no pueden absorberse en el intestino delgado. De este modo llegan intactos al intestino grueso, donde son metabolizados por las poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal transformándolos en ácidos grasos de cadena corta. La generación de estas moléculas beneficia la salud del huésped puesto que estimulan el flujo sanguíneo del colon y la reabsorción de los electrolitos (revisado por Korakli *et al.*, 2006).

La producción de β -glucanos por las BAL es poco frecuente comparada con la producción de α -glucanos, y no se presenta como carácter de especie o género. Solo se conocen algunas cepas productoras que pertenecen a los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus* y *Streptococcus*. Los β -D-glucanos están constituidos por cadenas lineales con enlaces (1,3) y con ramificaciones en posición (1,2) y, además, poseen un elevado peso molecular. La estructura de este tipo de β -D-glucanos, determinada por microscopía de fuerza atómica (Figura 5D.2), indica su potencial como texturizantes. Además, se han observado propiedades probióticas e inmunomoduladoras de las bacterias productoras (revisado por Werning *et al.*, 2012), lo que les confiere un valor añadido como componentes activos para la elaboración de alimentos funcionales.

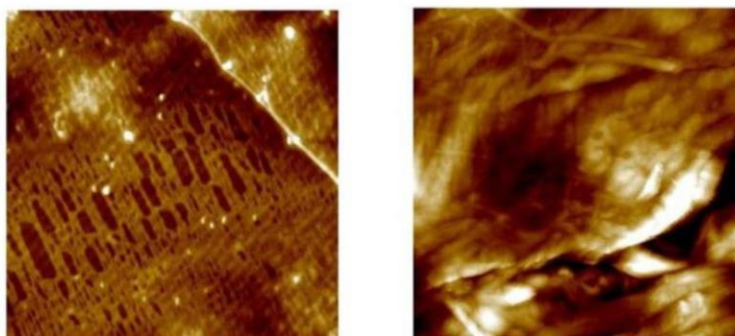


Figura 5D.2 Imágenes del β -(1,3)-glucano con ramificaciones (2,1) de *Lactobacillus suebicus* CUPV221 obtenidas por microscopía de fuerza atómica de contacto intermitente. Soluciones acuosas del biopolímero a 100 mg/mL fueron analizadas antes de (A, imagen de 2.5 x 2.5 μ m) o después de (B, imagen de 5 x 5 μ m) ser agitadas. Reproducido de Marieta y Dueñas (2010). En *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, pp. 537-545. A. Mendez-Vilas y J. Díaz (Eds.)

Los fructanos producidos por BAL son compuestos con un elevado peso molecular, siendo los géneros que los producen *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Weissella*. En la actualidad sólo se han descrito dos fructanos producidos por BAL: la inulina β -(1,2) y el levano β -(2,6) con ramificaciones en posición β -(2,1). El levano se considera un biopolímero funcional de aplicación en el campo alimentario, cosmético, químico y farmacéutico. Destaca su papel como prebiótico en la reducción del exceso de colesterol.

Los HePS producidos por BAL presentan una gran diversidad en cuanto a composición, estructura, masa molecular y capacidad de interactuar con proteínas, características que contribuyen a la solubilidad, reología y otras propiedades físicas de los polisacáridos. La producción y secreción de estos biopolímeros requieren de la acción sincronizada de varias enzimas y de proteínas implicadas en la síntesis de la unidad repetitiva, la determinación de la longitud de la cadena y su polimerización, así como de proteínas transportadoras (revisado por Werning *et al.*, 2012). Los HePS están constituidos por un esqueleto de unidades repetitivas lineales o ramificadas en diferentes posiciones, y según la cepa bacteriana, existe variación en cuanto al grado de ramificación y la longitud de la cadena. Las características del polímero como la composición monomérica, la disposición de los monosacáridos en la cadena, el número de ramificaciones, el carácter aniónico o neutro y la masa molecular influyen en las propiedades reológicas del mismo. Así, los HePS de masa molecular alta se han relacionado con la viscosidad de los medios en los que se encuentran. Además, algunos HePS de BAL tienen en común una gran capacidad espesante a concentraciones bajas. Cada una de las unidades repetitivas de los HePS puede estar constituida por entre tres a ocho monosacáridos diferentes, siendo los más frecuentes D-glucosa, D-galactosa y L-ramnosa, en sus formas anoméricas α o β . Independientemente de la diversidad de estos polímeros, se ha observado que la mayoría de los HePS de BAL contienen galactosa en su composición química. Se han encontrado también como monosacáridos constituyentes, la manosa, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, L-fucosa o ácido glucurónico pudiendo contener además sustituyentes de naturaleza no glicídica (fosfato, acetilo y glicerol). En función de su composición monomérica, los HePS sintetizados por BAL se han clasificado en hasta nueve grupos distintos (Mozzi *et al.*, 2006). Diferentes estirpes de BAL aisladas de productos lácteos, cereales y bebidas alcohólicas producen HePS. Pertenecen a los géneros *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii*, subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. rhamnosus*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*, *S. macedonicus*) y *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*).

5D.3 INFLUENCIA DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS EN LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LOS ALIMENTOS

Una de las prácticas más utilizadas desde la antigüedad para la conservación de los alimentos es la fermentación. Durante el proceso de fermentación las BAL metabolizan los carbohidratos de los alimentos, y como resultado transforman las materias primas confiriendo al producto final las características organolépticas típicas. La utilización de BAL productoras de EPS contribuye,

además, a mejorar las cualidades de los alimentos en cuanto a sus propiedades reológicas y funcionales, actuando como espesantes naturales. En el caso de leches fermentadas y quesos no grasos intervienen en los parámetros tecnológicos esenciales, ya que proporciona al producto una viscosidad adecuada y reducen la sinéresis, siendo también apropiadas para la elaboración de pasta o productos de panadería. La presencia de los EPS en los alimentos se ha relacionado con la mejora de la percepción del sabor de los mismos debido al mayor tiempo de retención de los alimentos viscosos en la boca. Sin embargo, los EPS también pueden desempeñar un papel importante en el deterioro de alimentos como se aprecia en el desarrollo de viscosidad en productos cárnicos y bebidas.

Actualmente, el consumidor demanda productos lácteos más cremosos, lo que ha determinado que las industrias lácteas deban desarrollar nuevas estrategias. Durante el proceso fermentativo del yogur, la lactosa que se encuentra en la leche se transforma en ácido láctico por la acción bacteriana, lo que provoca una bajada del pH. A consecuencia de todo ello, existe una desestabilización de la matriz y las caseínas terminan coagulando y formando un gel. Para conseguir yogures batidos, se realiza una homogeneización suave del coágulo de la leche después de la fermentación. Sin embargo, este tratamiento mecánico es muy agresivo, afecta a las propiedades reológicas del alimento y favorece su sinéresis (separación del suero). Así en la actualidad, las aproximaciones tecnológicas utilizadas para aumentar la calidad de los productos lácteos fermentados (reducir la sinéresis y aumentar la textura) han consistido en aumentar la proporción sólida de la leche con proteínas (caseínas), azúcares (sacarosa y fructosa) o estabilizantes (pectina, almidón, alginato y gelatina) cuando la legislación lo permite. Sin embargo, todas estas medidas no van en concordancia con las exigencias de los consumidores que demandan productos bajos en grasa, bajos en azúcar, con pocos aditivos y no muy caros. Por este motivo, una alternativa sería el uso de EPS, ya que éstos tienen una importante función como espesantes naturales. Son capaces de incrementar la viscosidad o de mejorar la textura y estructura de los productos en los que se encuentran sin alterar su sabor ni aroma. Su función estabilizante (unen el agua y limitan la sinéresis) depende de sus características físico-químicas (composición química, estructura tridimensional y tamaño) y de la interacción del EPS con los componentes de la leche (iones y proteínas). De hecho, el xantano producido por *Xanthomonas campestris* fue el primer EPS microbiano usado como aditivo. El problema es que su uso no está permitido en algunos países europeos ni en los Estados Unidos de América, a diferencia de los EPS producidos por BAL debido a su condición GRAS.

Existen numerosos estudios sobre EPS aislados de BAL procedentes de productos lácteos fermentados (yogures artesanales, kéfir, viili), vegetales y cereales que revelan una amplia diversidad de estos polímeros. Se estudian, además, las condiciones óptimas de producción para su implementación tecnológica en la industria de alimentos fermentados. Sin embargo, los niveles de producción de EPS, por parte de las BAL, aún en las condiciones óptimas de producción, son inferiores comparados con otros polímeros bacterianos. Así, el bajo rendimiento de producción hace que actualmente no sea factible el uso de los EPS producidos por BAL como aditivos.

alimentarios purificados. Sin embargo, el objetivo es que dichos compuestos actúen en el alimento ayudando a mejorar sus características organolépticas. Por ello, la estrategia más adecuada sería seleccionar como cultivos iniciadores de productos lácteos fermentados bacterias lácticas productoras de aquellos EPS que confieran las mejores propiedades sensoriales (textura y viscosidad) a los productos que se van a elaborar.

El kéfir es un ejemplo de producto elaborado de forma artesanal, sin aditivos añadidos y en el que además de los beneficios para la salud, el kefirán presente aporta ventajas tecnológicas interesantes. El kefirán es el principal EPS obtenido de los granos de kéfir y es producido por varios lactobacilos homofermentativos que incluyen cepas de las especies *L. kefiranofaciens* y *L. kefir*. El kefirán es un polisacárido, constituido equimolecularmente por D-glucosa y D-galactosa, que aporta a la leche una mejora de la viscosidad y viscoelasticidad, actuando como estabilizante, evitando la sinéresis y la granulosis y proporcionando un efecto espesante natural.

Algunos estudios han mostrado que otros productos no derivados de la leche, como los basados en cereales, son sustratos adecuados para el crecimiento de diferentes BAL y también para la producción de EPS. De nuevo, en este otro tipo de productos la síntesis de EPS durante la fermentación desempeña un papel importante en la viscosidad y textura final del producto, además de beneficios para salud, como por ejemplo, el β -glucano sintetizado por la cepa *P. parvulus* 2.6 en una bebida de avena, cuya ingestión produjo un descenso significativo en los niveles de colesterol en humanos. Además, la inclusión de BAL productoras de β -glucanos podría conferir a estos productos fermentados un aspecto viscoso en función de la interacción establecida entre el EPS y la matriz del alimento.

Por otra parte, la producción *in situ* de EPS por BAL durante la fermentación de pasta y pan parece ser una alternativa más natural a la adición de productos que mejoren la textura como los hidrocoloides. Los EPS sintetizados por BAL de tipo glucano como por ejemplo, el dextrano producido por cepas de las especies *L. mesenteroides* o *Weissella cibaria*, o bien fructanos como el levano sintetizado por *L. sanfranciscensis*, se han utilizado para estudiar la mejora de parámetros como la textura, humedad, volumen y retardo de su endurecimiento. El uso de los EPS de BAL es especialmente significativo en la mejora de la calidad de la textura de panes sin gluten. Otra ventaja que aportaría la inoculación de BAL en la producción de pan, especialmente con cepas lácticas homofermentativas productoras de EPS, sería el control del nivel de acetato, resultado del metabolismo de BAL heterofermentativas, que en cantidades controladas, mejoran el sabor y la estructura del pan, aunque la sobreproducción de acetato ejerce el efecto contrario, influyendo negativamente en el sabor.

En la elaboración de algunas bebidas alcohólicas se encuentran también las BAL que al utilizar distintos compuestos de los mostos, mejoran las características organolépticas de la bebida. De hecho las BAL disminuyen la acidez de éstos mediante la fermentación maloláctica que consiste en la transformación del ácido L-málico en un ácido más débil como el ácido L-láctico. Sin embargo, algunas cepas de BAL son capaces de provocar alteraciones que disminuyen la calidad de la bebida como el ahilado. El ahilado o aceitado se debe al EPS sintetizado por

ciertas cepas de BAL que al ser excretado a la bebida, aumenta la viscosidad de la misma. El ahilado constituye una de las principales alteraciones bacterianas que todavía ocurre ocasionalmente en vinos, cerveza y sidra natural. Esta alteración no implica ningún efecto sobre las características aromáticas de la bebida ni sobre la salud. Sin embargo, al aumentar los EPS la bebida se vuelve más viscosa, lo que provoca una sensación en boca de mayor untuosidad. Esta alteración sensorial hace que las bebidas sean rechazadas por el consumidor, causando pérdidas económicas cuantiosas en el sector de las bebidas alcohólicas. Las estirpes aisladas de bebidas ahiladas han sido identificadas como *Streptococcus mucilaginosus*, y diversas especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. En vinos, la especie más frecuentemente implicada es *P. parvulus*, si bien también han sido aisladas cepas de *O. oeni*. En sidras inglesas se ha relacionado esta alteración con el desarrollo de lactobacilos heterofermentativos como las especies *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus collinoides*, además de cocos pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus*. En la sidra natural vasca se han aislado cepas de *P. damnosus*, *P. parvulus* y *O. oeni* productoras de un β -glucano idéntico y diversas estirpes de *Lactobacillus*, algunas productoras del mismo β -glucano, pero principalmente de heteropolisacáridos.

Por otra parte, las BAL pueden alterar también productos cárnicos refrigerados y envasados al vacío. La alteración se reconoce por la presencia de limosidad o viscosidad en la superficie de las carnes, causada por los EPS sintetizados por algunas cepas de BAL al metabolizar los carbohidratos presentes en la superficie. En la mayoría de los productos cárnicos y las carnes se encuentran poblaciones pequeñas de BAL. Su crecimiento no siempre genera la alteración del producto, sin embargo, el incremento del crecimiento bacteriano puede provocar la producción de limos y otros cambios sensoriales como sabor ácido, mal olor, cambio de color y formación de gas. En los productos alterados, las estirpes con capacidad para sintetizar EPS que se han aislado más a menudo son de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. En la carne envasada al vacío y refrigerada, la composición de la atmósfera varía, lo que origina la inhibición del crecimiento de las bacterias aerobias y favorece la selección de bacterias capaces de crecer en presencia de CO₂ y a temperatura de refrigeración. Estas bacterias son principalmente ciertas estirpes de BAL de los géneros *Lactobacillus* (*L. sakei*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*) y *Carnobacterium*.

5D.4 CONTRIBUCIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS A LA FUNCIONALIDAD DE LOS ALIMENTOS

En la actualidad, el mercado de los alimentos funcionales se caracteriza por su alto grado de innovación. Continuamente se están desarrollando nuevos ingredientes que pueden aportar un beneficio extra para la salud, buscando la forma más adecuada de incluirlos en la dieta, ya sea como producto generado *in situ*, como ingrediente o como microorganismo vivo. En este contexto en los últimos años se está estudiando el efecto beneficioso de los EPS producidos por BAL, así como de las propias bacterias productoras, con el objeto de dilucidar su posible aplicación en la elaboración de alimentos funcionales.

En los siguientes sub-apartados se describen los resultados de estudios recientes que abordan distintos aspectos relacionados con el potencial prebiótico de los EPS o probiótico de las BAL productoras.

5D.4.1 LOS EXOPOLISACÁRIDOS COMO PREBIÓTICOS

Los oligosacáridos, compuestos por polímeros de un único monosacárido como la fructosa (FOS, inulina), galactosa (GOS), manosa (MOS) y glucooligosacáridos (β -glucanos), o bien por polímeros mixtos como la lactulosa o el lactitol son los prototipos de compuestos prebióticos (ver detalles en el capítulo 5A de este libro). Además, los polisacáridos (HoPS y HePS) también se consideran prebióticos. La mayoría de los compuestos contemplados actualmente como prebióticos tienen masa molecular baja y aunque los EPS producidos por BAL presentan mayoritariamente masas moleculares altas, la composición química de algunos EPS es similar a la de prebióticos de menor tamaño, haciendo posible su fermentación por determinadas bacterias intestinales. El efecto prebiótico ejercido por polímeros de cadena larga y de cadena corta es distinto en cuanto a que los segundos se metabolizan rápidamente en el colon proximal, mientras que los carbohidratos de cadena larga son fermentados lentamente en la región más distal del colon. En consecuencia, es importante identificar tanto los prebióticos susceptibles de ser metabolizados como las cepas específicas que los fermentan, especialmente aquellas estirpes con potencial probiótico. La degradación biológica de los EPS bacterianos implica la existencia de bacterias que posean enzimas específicas con capacidad para hidrolizar estos biopolímeros y además, esta biodegradación parece depender de la estructura espacial y primaria de los biopolímeros. En la actualidad existe muy poca información sobre el potencial prebiótico de EPS bacterianos. Hasta el año 2009, tan sólo se había demostrado el efecto prebiótico de fructanos producidos por cepas de la especie *L. sanfranciscensis*. Estudios realizados por Salazar *et al.*, (2009) con bacterias aisladas del tracto digestivo mostraron que en presencia de los HePS producidos por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 y *B. longum* subsp. *longum* IPLA E44 (filogenéticamente distintas al grupo de las BAL) existían cambios relevantes de las poblaciones de algunas bacterias anaeróbicas intestinales, así como en la cantidad de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico. Tsuda y Miyamoto (2010) evaluaron el efecto prebiótico del EPS producido por la cepa mutante *L. plantarum* 301102S en comparación con los prebióticos GOS e inulina con 37 cepas de BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. La actividad prebiótica detectada con los dos compuestos prebióticos, utilizados como control, resultó ser baja, así como el efecto observado con el EPS sobre cinco de las cepas ensayadas. Sin embargo, la estirpe *L. plantarum* 301102 utilizó específicamente el EPS producido por la cepa mutante *L. plantarum* 301102S y mostró la actividad prebiótica más alta. *L. plantarum* 301102 fue aislada de queso elaborado de forma artesanal y se ha descrito su supervivencia y proliferación en el tracto gastrointestinal de cerdos tras su administración oral. Aunque son necesarios más estudios para determinar la acción prebiótica de este EPS en el tracto digestivo *in vivo*, el hecho de que esta cepa sea capaz de

producir EPS en suero, es un ejemplo de las posibles aplicaciones industriales de las cepas productoras de dichos biopolímeros.

5D.4.2 CONTRIBUCIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS AL CARÁCTER PROBIÓTICO Y A LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Aunque no se conoce la función específica de estos polímeros, se considera que intervienen en la capacidad de adhesión bacteriana, en la formación de biopelículas y en la protección de la integridad celular en diferentes ambientes. Específicamente, en el caso de las BAL, la producción de EPS parece contribuir a su adaptación para colonizar sus múltiples nichos ecológicos: (i) desde entornos lácteos a bebidas alcohólicas y (ii) desde compuestos fermentables hasta entornos ambientales como el tracto digestivo o la mucosa vaginal. Así, esta contribución de los EPS a la capacidad de adaptación a distintos nichos ecológicos de las BAL parece estar implicado en su capacidad para ser organismos simbióticos, beneficiosos para el huésped y para sí mismos.

Como se ha descrito previamente, entre los efectos beneficiosos que se atribuyen a los EPS se encuentran la capacidad de reducir los niveles de colesterol sérico, así como de estimular el crecimiento de la microbiota intestinal. Pero además, por el hecho de encontrarse asociados a la superficie de las bacterias, pueden contribuir a su potencial como probióticos posibilitando el uso de éstas en la elaboración de alimentos funcionales.

La utilización de probióticos, tanto en alimentación como en clínica, requiere que cumplan las exigencias establecidas por los organismos oficiales competentes como son la FDA y la EFSA. En primer lugar, debe demostrarse que el microorganismo no es patógeno, no posee caracteres relacionados con virulencia o patogenicidad, no es resistente a antibióticos y, muy especialmente, se requiere evidencia científica mediante estudios rigurosos sobre las características beneficiosas que se le atribuyen. En este contexto en los últimos años se está estudiando el efecto beneficioso de los EPS sobre la capacidad de las BAL productoras para adaptarse y sobrevivir en el nicho ecológico del tracto digestivo después de su ingestión en alimentos.

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe presentar ciertas características relacionadas con su efecto beneficioso para la salud como por ejemplo, la capacidad de producir metabolitos o enzimas. También se puede seleccionar por su alta capacidad de adhesión a células epiteliales humanas que le permite competir con bacterias patógenas en la colonización del epitelio intestinal. Otras características deseables, que favorecen su función como probiótico son la resistencia a sales biliares y a jugos gástricos o la producción de compuestos antimicrobianos.

El microorganismo probiótico ha de ser capaz de resistir condiciones de estrés tanto tecnológicas como gastrointestinales. Por una parte, soportar el proceso de obtención del alimento funcional y su comercialización y, por otra, sobrevivir a las condiciones gastrointestinales después de la ingestión, como el estrés ácido y las sales biliares para así poder ejercer su función

en el punto de destino. Stack *et al.* (2010) demostraron que la expresión del gen *gtf* de *P. parvulus* 2.6, que codifica la GTF glicosiltransferasa en *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, la convierte en productora de (1,3)- β -D-glucano con ramificaciones (1,2). Como consecuencia, aumenta la resistencia de esta bacteria a las condiciones anteriormente mencionadas. Estos resultados ponen de manifiesto que la producción de este tipo de EPS en bacterias probióticas les confiere una protección frente a agentes externos.

La adhesión del probiótico a la mucosa gastrointestinal u otros epitelios favorece su colonización, dificultando el acceso de los patógenos y, por tanto, protegiendo al hospedador de la infección. La contribución del (1,3)- β -D-glucano con ramificaciones (1,2) en la capacidad de adhesión bacteriana ha sido extensamente analizada *in vitro* utilizando líneas celulares de epitelio intestinal humano. La adición del EPS purificado a cultivos de *L. plantarum* WCFS1 provoca un incremento de la capacidad de adhesión de esta bacteria probiótica (Russo *et al.*, 2012). Los estudios realizados con estirpes isogénicas de *P. parvulus* productoras y no productoras, y la eliminación del EPS de la superficie bacteriana de *Pediococcus* y *Lactobacillus* productores, han mostrado que la presencia del EPS, incrementa también la capacidad de adhesión de las cepas productoras (revisado por Werning *et al.*, 2012). Sin embargo, cabe resaltar que éste no es un efecto adscribible a todos los EPS, ya que la presencia de un EPS rico en galactosa en la superficie de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG disminuye su capacidad de adhesión.

Los EPS pueden constituir una barrera física en el epitelio que impida que se instalen los microorganismos patógenos. De hecho un estudio realizado con *Bifidobacterium breve* UCC2003, productora de EPS, y su cepa isogénica, puso de manifiesto la reducción de los niveles de colonización de *Citrobacter rodentium* (Fanning *et al.*, 2012). Así mismo, la presencia de *Lactobacillus acidophilus* A4 demostró una reducción significativa en la formación de biopelículas por el patógeno enterohemorrágico *Escherichia coli* O157:H7. (Kim *et al.*, 2009).

Algunas bacterias probióticas sintetizan EPS y son capaces de eliminar las especies de oxígeno reactivo (ROS) que se forman en el intestino por diversas reacciones metabólicas, por lo que exhiben actividades antioxidantes. Tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal, el estrés oxidativo juega un importante papel. El efecto de los EPS producidos por bacterias probióticas sobre el daño oxidativo producido en el intestino ha sido evaluado mediante sistemas modelo de ratas con colitis. Realizando un estudio comparativo entre dos cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, una gran productora de EPS (B3) y otra de bajo nivel de producción (A13), se observaron diferencias significativas entre ambas en lo que respecta a parámetros de estrés oxidativo, demostrando que el aumento de producción de EPS reduce el daño oxidativo y, por tanto, potencia la función probiótica de la cepa de mayor producción de EPS (Sengül *et al.*, 2011).

Los inmunomoduladores pueden ser algunos fármacos, moléculas orgánicas, estructuras y productos del metabolismo secundario de las bacterias, entre otros, que tienen un efecto beneficioso sobre el sistema inmunológico reduciendo la tasa de inflamación de un tejido, bien

por estimular la respuesta inmune, inmuno-estimulación, o bien por suprimir la respuesta, inmuno-supresión. La inmunomodulación es posible gracias a que el sistema inmune puede regularse tanto con moléculas exógenas como por moléculas endógenas, utilizando un sistema de reconocimiento mediado por la unión ligando-receptor. Este reconocimiento entre la molécula del ligando y su receptor desencadena una serie de reacciones en el interior de la célula que se traducen en la modulación de la transcripción génica.

Todavía no hay evidencias concluyentes de que los EPS sintetizados por BAL tengan propiedades inmunomoduladoras. Así, los EPS producidos por bacterias probióticas podrían intervenir en la modulación del sistema inmunológico del hospedador al interactuar con receptores específicos, bien estimulando una respuesta antiinflamatoria tras el contacto con el epitelio gastrointestinal, bien protegiendo al huésped de una respuesta inflamatoria.

En este sentido, los EPS además de ser reconocidos por receptores específicos y desencadenar una respuesta, pueden afectar al sistema inmune por medio de otros mecanismos. De hecho se ha propuesto que estas moléculas pueden competir con bacterias como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* o *Salmonella*, por el sitio de unión a los receptores de polisacáridos en las células inmunitarias, actuando como agentes anti-adhesivos impidiendo la unión de estos patógenos.

Recientemente se están estudiando nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes del intestino, que presentan una elevada prevalencia en los países desarrollados. En estas enfermedades está afectada la comunicación fisiológica entre las células del epitelio intestinal y las células del sistema inmune, lo que resulta en una producción elevada de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o IL-12, y provoca el consiguiente proceso inflamatorio. Esta inflamación intestinal adquiere mayor relevancia en el momento en que se vuelve crónica, como sucede en la enfermedad de Crohn.

Hasta el momento los tratamientos utilizados para mejorar la sintomatología de dicha enfermedad han sido la administración de anti-inflamatorios o inmunosupresores. Sin embargo recientemente se está intentando modular el sistema inmune a nivel intestinal, utilizando probióticos y prebióticos, con el fin de aumentar la concentración de IL-10. Esta molécula es capaz de regular la inflamación, inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, y además, está implicada en la respuesta humoral, estimulando la secreción de inmunoglobulinas G, M y A, por parte de linfocitos B. En estudios recientes realizados por Ming-Hsiu *et al.*, (2010) utilizando un modelo *in vivo* de mutantes deficientes en la producción de IL-10, se detectó un incremento del desarrollo de enfermedades intestinales. Así mismo, en dicho trabajo, mediante ensayos *in vitro*, se comprobó que el EPS producido por la cepa de *B. longum* BCRC 14634, ***aumentaba la proliferación de macrófagos y la producción de IL-10 mostrando un efecto inmunomodulador, lo cual podría favorecer la disminución de infecciones gastrointestinales siendo responsable el biopolímero.***

En relación a la respuesta inflamatoria, en un estudio comparativo, realizado con la estirpe *P. parvulus* productora de (1,3)- β -D-glucano con ramificaciones (1,2) y con estirpes mutantes no productoras, se ha detectado que la presencia del EPS disminuye la respuesta proinflamatoria de macrófagos humanos expuestos a esta cepa (revisado por Werning *et al.*, 2012).

Finalmente, en diversos estudios se han descrito otro tipo de efectos beneficiosos para la salud relacionados con los EPS. Entre ellos cabe destacar los realizados en modelos *in vitro* de epitelio intestinal humano que sugieren un posible efecto antitumoral de los EPS producidos por las BAL. Además, recientemente se ha demostrado en un modelo murino que el EPS producido por una cepa de *L. rhamnosus* inhibe la producción de autoanticuerpos artríticos lo que se manifiesta suprimiendo la artritis inducida por colágeno (CIA). Se trata de unos resultados que, aunque tienen que ser validados en pacientes humanos, revelan una potencial aplicación de los EPS en el desarrollo de alimentos funcionales con una función específica para prevenir enfermedades (Nowak *et al.*, 2012).

5D.5 CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas hasta el momento han revelado que los EPS sintetizados por BAL tienen interés en la industria alimentaria como espesantes, gelificantes y como mejorantes de la textura, sobre todo de productos lácteos. Ya que la producción natural de estos biopolímeros no es cuantitativamente demasiado elevada, su aplicación requiere de la síntesis *in situ* del EPS por BAL incluidas en los alimentos. De esta forma, los polímeros no se añaden como aditivos extras, evitando elevar los costes económicos, y además, los productos finales que contienen EPS no tienen un mayor contenido en grasa, ni hidrocoloides añadidos, y presentan la textura deseada por el consumidor.

Además del interés de los EPS producidos por BAL en la industria alimentaria, existe un potencial interés para la industria farmacéutica principalmente por su relación con los posibles beneficios en la salud. En el pasado, se creía que la activación del sistema inmune y de la respuesta adaptativa era debida exclusivamente a proteínas que funcionaban como antígenos, y que las bacterias habían desarrollado la cápsula para eludir este reconocimiento antigénico. Sin embargo, hoy en día, se sabe que los polisacáridos bacterianos también pueden activar la respuesta inmunitaria lo que los convierte en candidatos como nuevas dianas para la regulación del sistema inmune.

Finalmente, a pesar de que son necesarios más estudios relacionados con la posible utilización de los EPS como sustratos fermentables para las bacterias intestinales, y teniendo muy en cuenta su estructura química y su funcionalidad, es evidente que dichos EPS producidos por BAL, podrían ofrecer un valor añadido a los productos que los incluyeran, gracias a su efecto prebiótico lo que les permitiría competir en un mercado cada vez más potente.

REFERENCIAS

1. Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., y Villani, F. (2010). Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation. *J. Food Sci.* 75:28-35.
2. Badel, S., Bernardi, T. y Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotech. Advan.* 29:54-66.
3. Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P. y Spano, G. (2012) Lactic Acid Bacteria producing β -group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:1383-1394.
4. Fanning, S., Hall, L.J. y van Sinderen D. (2012) *Bifidobacterium breve* UCC2003 surface exopolysaccharide production is a beneficial trait mediating commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Gut Microbes.* 3:420-425.
5. Kim, Y., Oh, S. y Kim, S.H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379:324-329.
6. Korakli, M. y Vogel, R.F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:790-803.
7. Ming-Hsiu, W., Pan T.-M., Wu Y.-J., Chang, S.-J., Ming-Song, Chang, M.-S. y Hu C.-Y. (2010) Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. *Int. J. Food Microbiol.* 144:104-110.
8. Mozzi, F., Viningelgem, Hérbet, E.M., van der Meulen, R. Foulquié-Moreno, M.R., Font de Valdez, G. y de Vuyst, L. (2006). Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4431-4435.
9. Nowak, B., Ciszek-Lenda, M., Sróttek, M., Gamian, A., Kontny, E., Górski-Frączek, S. y Marcinkiewicz, J. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharide ameliorates arthritis induced by the systemic injection of collagen and lipopolysaccharide in DBA/1 mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 60:211-220.
10. Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Kolida, S., Collins, M., Rastall, R., Gibson, G. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2009). Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 135:260-267.
11. Sengül, N., Işık, S., Aslım, B., Uçar, G. y Demirbağ, A.E. (2011). The effect of exopolysaccharide-producing probiotic strains on gut oxidative damage in experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 56:707-714.

12. Russo, P., López, P., Capozzi, V., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M.T., Spano, G. y Fiocco, D. (2012). Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *Int. J. Mol. Sci.* 13:6026-6039.
13. Stack, H.M., Kearney, N., Stanton, C., Gerald F. Fitzgerald, G.F. y Ross, R.P. (2010). Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 6:500–507.
14. Tsuda, H. y Miyamoto, T. (2010). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Sci. Technol. Res.* 16:87-92.
15. Werning, M.L., Notararigo, S., Nácher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R. y Lopez, P. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Chapter 5 In: *Food additives*. pp. 83-114. El-Samragy, Y. (Ed.). Intech. Croacia.
16. Zannini, E., Pontonio, E., Waters, D.M., y Arendt, E.K. (2012). Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:473-485.

